

**Untersuchungen zur Wirkungsweise von
Birkenblättern (Betulae folium)
und phenolischer Verbindungen, unter
besonderer Berücksichtigung der Beeinflussung
von Metallopeptidasen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Hedda Major, geb. Bormann
geboren am 10. Februar 1972 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. M.F. Melzig

 2. Prof. Dr. K. Hiller

 3. Prof. Dr. H. Schilcher

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 2002

Abstract

Die Anwendung von Birkenblättern (*Betulae folium*) erfolgt zur Durchspülung der Harnwege. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkungsweise der Birkenblätter auf verschiedenen Ebenen der Phytopharmakaforschung untersucht. Zunächst wurde *in-vitro* die Beeinflussung der Metallopeptidasen Neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11), Angiotensin-Converting-Enzym (ACE, EC 3.4.15.1) und Leucin-Aminopeptidase (LAP, EC 3.4.11.2) durch Birkenblätterextrakte, -fraktionen und reine Naturstoffe untersucht. Die Auftrennung eines Methanol- und eines Ethylacetatextraktes führte nicht zur Gewinnung einzelner, für die Gesamtwirkungen der Extrakte verantwortlichen Fraktionen bzw. Komponenten. Die Eigenschaft der Flavonoide als wirksamkeitsmitbestimmende Inhaltsstoffe konnte jedoch bestätigt werden. Ein systematisches Screening von Flavonoiden ergab u.a., dass das Ausmaß der Enzymhemmung von der Anzahl der freien phenolischen OH-Funktionen bestimmt wurde und dass Flavonoidaglyka stärker die Enzyme hemmten, als die im Pflanzenmaterial vorliegenden Glykoside (IC_{50} NEP: Myricetin 42 μ mol/l, Quercetin 192 μ mol/l). Die in der Birkenrinde vorkommenden Triterpene Betulinsäure und Betulinol wurden als starke Inhibitoren der LAP erkannt (IC_{50} 7,3 \pm 1,4 bzw. 8,8 \pm 1,78 μ mol/l). In einem nächsten Abschnitt der Arbeit wurden die Absorptionseigenschaften von Hyperosid und Rutin mit einem *In-vitro*-Perfusionsmodell am isolierten Rattendünndarm untersucht. Sowohl Rutin als auch Hyperosid traten unverändert als Glykoside durch den Darm in das Akzeptorkompartiment über. Auch in Form eines Birkenblätterextraktes wurde Hyperosid am Rattendünndarm absorbiert, der Extrakt veränderte jedoch nicht die Absorptionsrate. Als Mechanismus wurde der passive Transport durch die Poren der Tight junctions der Dünndarmzellen angenommen. Abschließend wurde eine Pilotstudie (n=14) durchgeführt, in der das ausgeschiedene Harnvolumen nach einmaliger Einnahme eines Birkenblättertees im Vergleich zu einer entsprechenden Menge Leitungswasser bestimmt wurde. Bei 50 % der Probanden wurde innerhalb der vierstündigen Testphase eine Zunahme der Harnproduktion beobachtet, bei den anderen 50 % stellte sich eine gegensätzliche Reaktion auf Tee und Placebo ein. Eine signifikante Erhöhung der Harnproduktion konnte somit, unter dem angegebenen Studiendesign, nicht nachgewiesen werden.

Abstract

Irrigation of the urinary tract is the therapeutic indication for Birch leaf (*Betulae folium*). In the present thesis, effects and efficacy of Birch leaves were investigated in various fields of medicinal plant research. The effects of Birch leaf extracts, their fractions, and pure natural compounds on the metallopeptidases - Neutral Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11), Angiotensin Converting Enzyme (ACE, EC 3.4.15.1), and Leucine Aminopeptidase (LAP, EC 3.4.11.2) - were investigated *in vitro*. Phytochemical separation of extracts obtained by methanol and ethyl acetate did not result in more active fractions compared to those of the whole extracts. The ability of flavonoids to contribute to the efficacy reached by Birch leaf extracts, could be confirmed. A systematic screening could show that the inhibitory potency of flavonoids is dependent on the number of phenolic hydroxyl functions in their chemical structure. Aglycones of flavonoids were more active than their corresponding glycosides occurring in the plant material (IC₅₀ NEP: myricetin 42 µmol/l, quercetin 192 µmol/l). Betulinic acid and betulinol, triterpenes of the bark of *Betula*, inhibited LAP strongly by reaching an IC₅₀ of $7,3 \pm 1,4$ µmol/l and $8,8 \pm 1,78$ µmol/l, respectively. Furthermore, this thesis showed the absorption profiles of hyperoside and rutin in an isolated small intestine model of the rat. Both glycosides were detected in the acceptor compartment without being metabolised. Administration of hyperoside by a Birch leaf extract did not influence the absorption rate. A passive transport through the pores of the tight junctions, localized between the intestinal cells, was considered to be the mechanism of absorption of the flavonol glycosides. Finally, a human pilot study (n=14) was carried out. The excreted urinary volume was determined after a single intake of a Birch leaf infusion or tap water. An increased urine output after 4 hours of the test period was found in 50% of the volunteers. In the contrary, an opposite effect was determined in 50% of the volunteers after administration of the herbal infusion and of a placebo solution. Thus, no significant increase of urine volume could be observed under these test conditions.

Birke
Betula
Flavonoide
Hyperosid
Polyphenole
Betulinsäure
Metallopeptidasen
NEP
ACE
LAP
Absorption
Diurese

Birch
Betula
flavonoids
hyperoside
polyphenols
betulinic acid
metallopeptidases
NEP
ACE
LAP
absorption
diuresis

Abkürzungsverzeichnis:

α_{Hyp}	Selektivität, relative Retention bzgl. Hyperosid
α_{Nar}	Selektivität, relative Retention bzgl. Naringin
Abs	Absorption
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACN	Acetonitril
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
AMG	Arzneimittelgesetz
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
BGA	Bundesgesundheitsamt
DAB	Deutsches Arzneibuch
Dammaranester 1	Dammar-24-en-12-O-acetyl-3 α ,12 β , 20(S)-trihydroxy-3-(hydrogen-propandioat)
Dammaranester 2	Dammar-24-en-12-O-acetyl-3 α ,12 β ,17 α ,20(S)-tetrahydroxy-3-(hydrogen-propandioat)
Dammaranester 3	Dammar-23(E)-en-12-O-acetyl-3 α ,12 β ,20(S),25-tetrahydroxy-3-(hydrogen-propandioat)
DC	Dünnschichtchromatographie
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
EC	Enzyme Commission
EGCG	Epigallocatechingallat
ESCOP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
EthacExtr.	Ethylacetatextrakt
F_n	Resorptionsquote in % nach n-ter Probenentnahme
gal	Galactose
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
Hip-His-Leu	Hippuryl-His-Leu
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HWExtr.	Heißwasserextrakt
k.H.	keine Hemmung

LAP	Leucin-Aminopeptidase
Leu-pNA	Leucin-p-Nitroanilid
MeOH	Methanol
MeOH Extr.	Extrakt aus 80%igem Methanol
MS	Massenspektrometrie
Myr-gal	Myricetin-3-galactosid
n.b.	nicht bestimmt
NEP	Neutrale Endopeptidase
OPC	Oligomere Proanthocyanidine
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch (Pharmacopoea Europaea)
pNA	p-Nitroanilin
PPC	Polymere Proanthocyanidine
Q-glucA	Quercetin-3-glucuronid
R	Spannbreite (Range)
R_F	Retentionsfaktor
R_n	Resorptionsrate in nmol/cm nach n-ter Probenentnahme
RGG	Rohglykosidgemisch
rha	Rhamnose
rut	Rutinose
SAAP-AMC	N-Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-Amido-4-methylcumarin
SC	Säulenchromatographie
SGLT-1	Natrium-Glucose-Cotransporter 1
t_R	Retentionszeit
U	unit (Enzymaktivität, $U = 1 \mu\text{mol/min}$)

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNGEN	1
1.1	Überblick zu Birke und Birkenblättern (Betulae folium)	1
1.1.1	Botanik	1
1.1.2	Pharmazeutische Anwendung	1
1.2	Metallopeptidasen – Begriffsdefinition, Molekularbiologie	5
1.3	Physiologische Bedeutung der untersuchten Enzyme	6
1.3.1	NEP (EC 3.4.24.11)	7
1.3.2	ACE (EC 3.4.15.1)	8
1.3.3	LAP (EC 3.4.11.2)	10
1.4	Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit	12
2	ERGEBNISSE	14
2.1	Effekte von Birkenblätterextrakten auf die Aktivität von Metallopeptidasen	14
2.1.1	Herstellung und phytochemische Charakterisierung der Extrakte	14
2.1.2	Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch Extrakte	17
2.1.3	Auftrennung des methanolischen Extraktes und Beobachtung der NEP-Beeinflussung durch die hergestellten Fraktionen	19
2.1.4	Untersuchung zur wirksamsten Fraktion des methanolischen Extraktes	22
2.1.5	Gerbstoffeigenschaften von Birkenblättern und Birkenblätterextrakten	22
2.1.6	Orientierende Versuche zum Vergleich der Enzymhemmungen vor und nach Hautpulverbehandlung	23
2.1.7	Fraktionierung des Ethylacetatextraktes und Beobachtung der NEP-Beeinflussung der hergestellten Fraktionen	24

2.1.8	Testung von Extrakten anderer Pflanzen	27
2.1.8.1	<i>Solidago virgaurea</i> L.	28
2.1.8.2	<i>Crataegus</i> -sp.	29
2.1.8.3	<i>Camellia sinensis</i> (L.)O.Kuntze	31
2.2	Effekte von Einzelstoffen auf die Aktivität von Metallopeptidasen	32
2.2.1	Screening von Flavonoiden	32
2.2.1	Screening von Flavonoidmetaboliten	37
2.2.2	Screening von Phenylpropanderivaten, Ononin sowie Verbindungen mit mehrfacher Hydroxysubstituierung	38
2.2.3	Screening von Catechin und abgeleiteten Verbindungen	40
2.2.4	Screening von Triterpenen	42
2.2.4.1	Saponine und Sapogenine	42
2.2.4.2	Betulinsäure und Betulinol	43
2.3	Resorptionsuntersuchungen am isolierten Rattendünndarm	46
2.3.1	Vorversuche mit Flavonoiden	46
2.3.2	Qualitativer Nachweis der Flavonoide in den Akzeptormedien	47
2.3.3	Quantitative Bestimmung der absorbierten Flavonoide	49
2.4	Pilotstudie zum Wirksamkeitsnachweis von Birkenblättern	53
3	DISKUSSION	62
3.1	Fraktionierung von Birkenblätterextrakten unter Beobachtung der NEP-Beeinflussung	62
3.2	Beeinflussung von Metallopeptidasen durch Flavonoide und verwandte Verbindungen	64

3.3	Gerbstoffe in Pflanzenextrakten und Interaktionen bei pharmakologischen Testungen	66
3.4	Bewertung der Ergebnisse mit Birkenblätterextrakten im Vergleich zu anderen Pflanzenextrakten	67
3.4.1	<i>Solidago</i> -, <i>Crataegus</i> - und Grüntee-Extrakte	67
3.4.2	Rotweineextrakt, Quercetin und Resveratrol - Beeinflussung von NEP und ACE an SK-N-SH-Zellen	69
3.5	Betulinsäure und Betulinol als Inhibitoren der LAP	72
3.6	Resorptionsuntersuchungen am Rattendünndarm-Modell	74
3.7	Pilotstudie mit Birkenblätterttee	81
4	EXPERIMENTELLER TEIL	86
4.1	Bezugsquellen von Substanzen und Biochemikalien	86
4.2	Extraktherstellung	89
4.2.1	Pflanzenmaterial	89
4.2.2	Wässriger Birkenextrakt	89
4.2.3	Extrakte mit organischen Lösungsmitteln	89
4.2.3.1	Petrolether und Ethylacetat	89
4.2.3.2	80%iges Methanol	89
4.2.4	Aceton-Wasser-Extrakt für den Proanthocyanidinnachweis	90
4.3	Arzneibuchmethoden zur Gehaltsbestimmung	90
4.3.1	Flavonoidgehalt von Birkenblättern und Heißwasserextrakt	90
4.3.2	Gerbstoffgehalt von Birkenblättern und methanolischem Extrakt	90
4.4	Dünnschichtchromatographie	91
4.5	Auftrennung von Extrakten durch Säulenchromatographie	92

4.5.1	Auftrennung des methanolischen Extraktes	92
4.5.2	Auftrennung des Ethylacetatextraktes	94
4.6	Charakterisierung der Birkenblätter als Gerbstoffdroge	98
4.6.1	Catechin	98
4.6.2	Proanthocyanidine	99
4.7	HPLC-Analyse von Flavonoiden	99
4.8	Enzymbestimmungen	101
4.8.1	Puffer und Testsubstanzlösung	101
4.8.2	Statistik	102
4.8.3	Bestimmung der NEP-Hemmung	102
4.8.4	Bestimmung der NEP-Hemmung von Extrakten nach Hautpulverbehandlung	105
4.8.5	Bestimmung der NEP-Aktivität im Urin	105
4.8.6	Bestimmung der ACE-Hemmung	106
4.8.7	Bestimmung der LAP-Hemmung	108
4.9	Resorptionsuntersuchungen am isolierten Rattendünndarm	109
4.9.1	Aufbau und Funktionsweise der Apparatur	109
4.9.2	Kontrolle von Viabilität und Integrität der Darmsegmente	110
4.9.2.1	Glucose-Bestimmung	110
4.9.2.2	Fluoreszenz-Messung	111
4.9.2.3	Visuelle Beurteilung	111
4.9.3	Probenaufbereitung und Flavonoidbestimmung	111
4.9.4	Mathematische Berechnungen zu den resorbierten Substanzen	112
4.9.5	Stabilität der Testsubstanzen	114

4.10	Pilotstudie zum Wirksamkeitsnachweis von Birkenblättern	115
4.10.1	Studienplan der Pilotstudie	115
4.10.2	Gemessene Parameter	115
4.10.3	Elektrolytbestimmung mit Atomabsorptionsspektroskopie	116
5	ZUSAMMENFASSUNG	117
6	LITERATURVERZEICHNIS	122

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNGEN

1.1 Überblick zu Birke und Birkenblättern (*Betulae folium*)

1.1.1 Botanik

Die Gattung *Betula* ist in den gemäßigten bis subarktischen Zonen der Nordhalbkugel verbreitet, die meisten der etwa 60 Arten sind in Zentral- und Ostasien heimisch. In Deutschland sind vier Arten heimisch, häufig anzutreffen sind die Hänge-Birke (*Betula pendula* Roth) und die an feuchtere Standorte gebundene Moor-Birke (*Betula pubescens* Ehrh.). Seltener, geschützte Arten sind die Zwerg-Birke (*Betula nana* L.) und die Niedrige Birke (*Betula humilis* Schrank). Birken neigen zu Bastardisierung, Zwischenformen der Hänge- und Moorbirke kommen vor, ebenso sind zahlreiche Gartenformen gezüchtet worden. Eine weitere heimische Gattung der Birkengewächse (Betulaceae) ist die Erle (*Alnus*). Pflanzen der Familie Betulaceae sind einhäusige Bäume oder Sträucher mit eingeschlechtigen Blüten in Kätzchen. Das Perianth ist stark reduziert oder fehlend, da die Bestäubung durch den Wind erfolgt. Früchte sind geflügelte Nüsse. Die beiden häufigsten Birken-Arten lassen sich von einander durch die folgenden Merkmale unterscheiden. *Betula pendula* Roth hat einen geraden Stamm und überhängende Zweige, die Blätter sind dreieckig-rautenförmig mit kaum abgerundeten Seitenecken, die Äste von *Betula pubescens* Ehrh. wachsen hingegen aufsteigend, die Blätter sind eiförmiger und wie die jungen Zweige samtig behaart. Eine weiße Rinde ist für beide Arten charakteristisch (Schubert et al. 1994, Czygan 1989, Steinecke und Schubert 2001, Schutzgemeinschaft Deutscher Wald e.V. 2001).

1.1.2 Pharmazeutische Anwendung

Die Birke ist wegen ihrer weiten Verbreitung eine traditionelle Arzneipflanze in vielen europäischen Ländern. Volksmedizinisch genutzt werden die Blätter (*Betulae folium*), die Rinde (*Betulae cortex*) zur Gewinnung des Birkenteers (*Betulae pix*), die Knospen (*Betulae gemmae*) und der durch Bohrungen in den Stämmen ausgetretene Blutungssaft (*Betulae succus*) (Gorecki und Seiz 1992, Czygan 1989).



Abbildung 1: Zweige von *Betula pendula* Roth, unten mit ♀ und ♂ Blütenständen, oben mit Fruchständen (nach Volak und Stodola 1983)

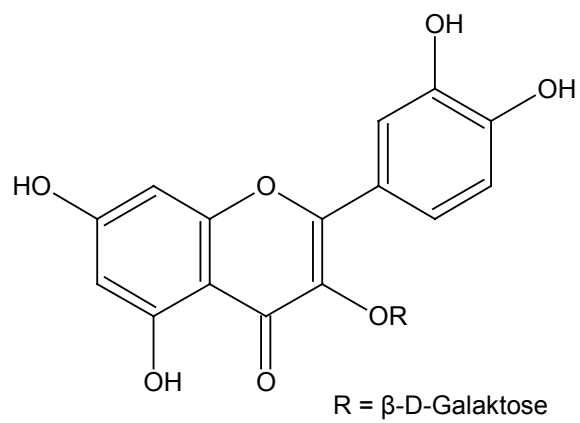


Abbildung 2: Hyperosid, das Hauptflavonoid der Birkenblätter

Seit dem Erscheinen des DAB 7 (1968), ohne die Übernahme des Birkenteers (Pix betulina DAB 6), ist nur noch die Droge Birkenblätter mit einer Monographie im Arzneibuch vertreten. 1998 wurde die Monographie neu in die Ph.Eur. aufgenommen. Als drogenliefernde Arten sind *Betula pendula* Roth und *B. pubescens* Ehrh., sowie Hybriden beider Arten zugelassen.

In der Blattdroge sind Flavonoide vom Flavonoltyp, hauptsächlich Quercetin- und Myricetinglykoside enthalten. Einen Mindestgehalt von 1,5 % Flavonoide, berechnet als Hyperosid, fordert die Definition der Droge nach Ph. Eur., der Gehalt der getrockneten Blätter liegt normalerweise bei 2-3 %. Weitere phenolische Inhaltsstoffe sind Phenolcarbonsäuren, Gallussäurederivate und Proanthocyanidine. Die Droge enthält entgegen früheren Angaben keine Saponine. Die Identifizierung von Triterpenestern und nicht von -glykosiden war das Resultat der Suche nach den hämolytisch wirksamen Komponenten der Birkenblätter. Weiterhin sind Ascorbinsäure, ätherisches Öl und mineralische Bestandteile, insbesondere Kaliumsalze, in den getrockneten Blättern enthalten (Hänsel und Hörhammer 1954, Rickling und Glombitza 1993, Gorecki und Seiz 1992, Czygan 1989, Wichtl 1999).

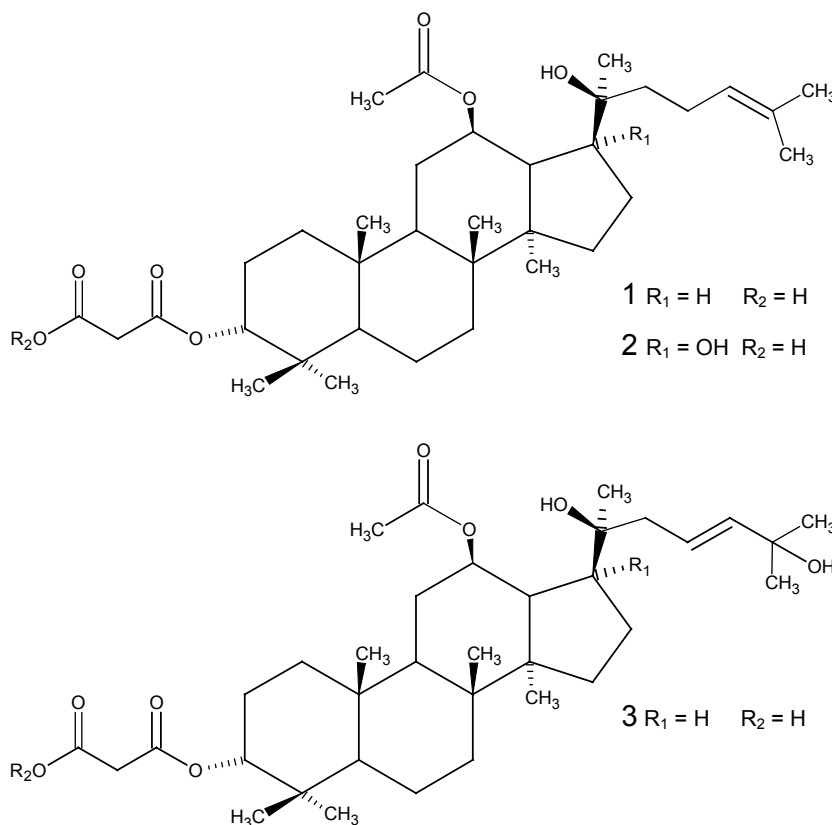


Abbildung 3: Dammaranverbindungen in Birkenblättern (nach Rickling und Glombitza 1993)

In der Volksmedizin werden Birkenblätter als Tee wegen ihrer harntreibenden Wirkung zur „Blutreinigung“ in Frühjahrskuren, bei Gicht und Rheuma, sowie weiterhin bei Haarausfall und Hautausschlag angewendet (Gorecki und Seiz 1992, Czygan 1989).

Die Kommission E des BGA bewertete 1986 die Droge positiv und beschränkte die wissenschaftlich akzeptierte Anwendung auf die Durchspülung bei bakteriellen und entzündlichen Erkrankungen der ableitenden Harnwege und bei Nierengriß, sowie zur unterstützenden Behandlung rheumatischer Beschwerden. Auf europäischer Ebene wurden die Birkenblätter 1996 von der ESCOP ebenfalls positiv monographiert. Als Indikation wurde die Durchspülung der Harnwege bei Entzündungen und Nierengriß, sowie die Anwendung als Adjuvans bei der Behandlung bakterieller Infektionen der Harnwege angegeben. Als Dosierung wird die mehrmalige tägliche Einnahme von 2-3 g Droge empfohlen, die Anwendung kann als Drogenaufguss, Trockenextrakt, Tinktur oder Frischpflanzenpresssaft erfolgen.

In der Praxis werden Birkenblätter überwiegend in Form von Arzneitees angewendet, häufig als Blasen-und-Nieren-Tee in der Kombination mit anderen Drogen, z.B. Goldrutenkraut, Schachtelhalmkraut, Hauhechelwurzel, Orthosiphonblättern und Bärentraubenblättern. Fertigarzneimittel enthalten Trockenextrakte aus Birkenblättern, die ebenfalls mit Wasser als Auszugsmittel hergestellt werden.

Grundlage der positiven Aufbereitungsmonographien von BGA und ESCOP war insbesondere der Wirkungsnachweis für alkoholische und wässrige Birkenblätterrauszüge an Ratten durch Schilcher und Rau (1988). Vorhergehende Untersuchungen erfolgten ebenfalls als Tierversuche und lagen mehrere Jahrzehnte zurück. Durch Schilcher wurde auch der Begriff der Aquarese eingeführt. Pflanzliche Zubereitungen führten nach Bilanzrechnung der Elektrolyte bei einer Steigerung der Harnausscheidung, im Unterschied zu den synthetischen Diuretika (Saluretika), zu keiner vermehrten Ausscheidung von Na^+ -, K^+ - oder Cl^- -Ionen. Deshalb sollten pflanzliche „Diuretika“, so auch die Birkenblätter, korrekter als Aquaretika oder Durchspülungsmittel bezeichnet werden (Schilcher 1992).

Die wirksamen Drogeninhaltsstoffe der Birkenblätter sind nicht genau bekannt, einerseits korrelierte der aquareetische Effekt mit der Flavonoidkonzentration, andererseits können auch die Elektrolyte in der Droge einen Beitrag zur harntreibenden Wirkung leisten. Für die Birkenblätter muss daher die Droge bzw. der Gesamtextrakt als Wirkstoff angesehen werden. Der geforderte Gehalt an Flavonoiden in der Droge ist demnach ein Maß für die Drogenqualität. Bei der Zubereitung von Tees oder der Einnahme von Fertigarzneimitteln sollten die Dosierungshinweise nach ESCOP hinsichtlich der Drogenmenge Birkenblätter eingehalten werden (Schilcher und Rau 1988, Gorecki und Seiz 1992, Nahrstedt 1993, *Betulae folium* (ESCOP-Monographie), Dingermann 2000).

1.2 Metallopeptidasen – Begriffsdefinition, Molekularbiologie

Etwa ein Drittel der bekannten Enzyme benötigt Metallionen, um eine optimale bzw. vollständige katalytische Aktivität zu besitzen. Metallionen dienen einerseits der Bildung und Stabilisierung der aktiven Enzymstruktur, sehr häufig übernehmen Ca^{2+} -Ionen diese Funktion, andererseits sind insbesondere die Ionen von Nebengruppenelementen unmittelbar an der Katalysefunktion beteiligt. Der bedeutendste dieser Cofaktoren in der Natur ist das Zn^{2+} -Ion (Schellenberger 1989).

Metallopeptidasen bzw. –proteasen sind Peptidasen, die für ihre Katalysefunktion Metallionen, in der Regel Zink, als Cofaktoren benötigen. Das Kation wird durch Chelatstrukturen an das Protein gebunden, das Substrat und ein Wassermolekül bilden weitere Liganden. Durch die Eigenschaft des Zentralatoms des Chelatkomplexes als Lewissäure wird das Substrat polarisiert, d.h. der Carbonylsauerstoff wird elektrophil. Das Wassermolekül wird ebenfalls durch die Wechselwirkung mit dem Metallion aktiviert, es reagiert nucleophil. Das Ergebnis der Reaktion zwischen elektrophilem und nucleophilem Partner ist die hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung des Substrates (Schellenberger 1989, Hooper 1996). Alle Metallopeptidasen bzw. –proteasen werden bei der EC-Klassifizierung der Enzymklasse 3.4. zugeordnet, wobei an Peptidasen die Codierungen 3.4.11 bis 3.4.19 vergeben werden. Innerhalb der Proteasen bilden die Metallo-Proteasen die eigene Gruppe 3.4.24 (Teuscher 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Naturstoffen auf die Aktivität der Metallo-Protease Neutrale Endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11), der Peptidyl-Dipeptidase Angiotensin-Converting-Enzym (ACE; EC 3.4.15.1) und der Aminopeptidase Leucin-Aminopeptidase (LAP; EC 3.4.11.2) untersucht. Trotz verschiedener EC-Klassifizierung, aufgrund der Aminosäurezahl der Spaltungsprodukte, besitzen die drei Enzyme große Ähnlichkeit im Aufbau des aktiven Zentrums. Nach Art der zinkbindenden Liganden (hier His, His, Glu), deren Anordnung in der Aminosäuresequenz sowie der Beteiligung weiterer Aminosäuren (hier Glu) an der Katalyse, wurden alle drei Enzyme der Familie „Gluzincins“ zugeordnet (Hooper 1994). Bei der Entwicklung von Enzyminhibitoren wurden Substanzen synthetisiert, die als „mixed inhibitors“ mehrere Metallopeptidasen in ihrer Aktivität hemmen. Als Beispiele seien für eine NEP-LAP-Kombination Kelatorphan und als NEP-ACE-Inhibitoren Mixanpril und Omapatrilat aufgeführt (Beaumont et al. 1996, Trippodo et al. 1998).

Eine weitere Gemeinsamkeit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme ist ihre Lokalisation in bzw. an der Zelle. Als Ektoenzyme sind sie an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert. Neben einem kurzen intrazellulären Bereich und einer Trans-Membran-Region ragt deren Hauptteil, einschließlich des aktiven Zentrums, in den Extrazellularraum hinein (Vlahovic und Stefanovic 1998, Konkoy und Davis 1996).

1.3 Physiologische Bedeutung der untersuchten Enzyme

NEP, ACE und LAP sind als Peptidasen für die Spaltung von Peptidhormonen bzw. Neuropeptiden verantwortlich, je nach Substrat kann dieser Abbau Aktivierung oder Inaktivierung des entsprechenden Hormons bedeuten. Peptidhormone sind hydrophil und daher nicht in der Lage, die Zellmembran zu passieren, deshalb wird ihr Hormonsignal über Rezeptoren an der Zellmembran vermittelt. Auch ihr Abbau erfolgt durch an der Zelloberfläche lokalisierte Ektoenzyme. Über die Hormonausschüttung und die Expression dieser Rezeptoren und Enzyme reguliert der Organismus auf drei Ebenen die verschiedensten physiologischen Parameter.

Die physiologische Bedeutung und die gezielte pharmakologische Nutzbarkeit von Inhibitoren der einzelnen, für den Peptidabbau verantwortlichen Enzyme ergibt sich aus deren Substratspezifität und Gewebeverteilung.

1.3.1 NEP (EC 3.4.24.11)

Durch NEP werden Oligopeptide auf der N-terminalen Seite von hydrophoben Aminosäuren (Phe, Met, Leu) gespalten, wichtige Substrate sind die natriuretischen Peptide, Enkephaline und Bradykinin. Das Enzym ist im Organismus in vielen Geweben nachweisbar, in der Peripherie sind besonders die Bürstensaummembranen von Niere und Darm durch starke NEP-Aktivität gekennzeichnet. Da im ZNS die NEP als synaptische Peptidase wesentlich zum Abbau der opioden Peptide beiträgt, erhielt sie auch die Bezeichnung „Enkephalinase“. Weiterhin stellte sich heraus, dass die Antigene KELL (Oberflächen-Antigen von Erythrocyten), CALLA (common acute lymphoblastic leukaemia antigen) und CD10 (Cluster-Differenzierungs-Antigen an Leukozyten) mit NEP identisch sind (Kenny 1986, Beaumont et al. 1996, Turner und Tanzawa 1997, Koehne 1997, Walter et al. 1997).

NEP-Inhibitoren wurden anfänglich mit dem Ziel entwickelt, durch eine Halbwertszeitverlängerung der endogenen Opioide eine physiologische Analgesie zu erzeugen. Bislang haben die Untersuchungen auf diesem Gebiet, auch mit neu entwickelten dualen NEP-LAP-Inhibitoren, das Stadium der pharmakologischen Testungen im Tierversuch noch nicht überschritten (Chipkin 1986, Beaumont et al. 1996, Chen et al. 2001). Durch chemische Strukturveränderungen der NEP-Inhibitoren wurden pharmakologische Wirkungen in anderen Geweben erreicht. So kann die Erhöhung der Enkephalinkonzentration im Darm durch NEP-Hemmstoffe therapeutisch genutzt werden. Der antidiarrhoische Effekt des NEP-Inhibitors Racecadotril (syn. Acetorphan, Tiorfan[®]) ist vergleichbar mit der Wirkung von Loperamid, einem in der Praxis bewährten Opiat-Rezeptor-Agonisten (Beaumont et al. 1996, Schwartz 2000).

Die Funktion der renalen NEP im Bürstensaum des proximalen Tubulus besteht in der Inaktivierung von zirkulierendem Atrialen Natriuretischen Peptid (ANP) sowie dessen Homologen, B- und C-Typ-natriuretisches Peptid und Urodilatin. ANP, ein zyklisches Peptid aus 28 Aminosäuren, wird von den Myozyten der

Herzvorhöfe als Antwort auf den Stimulus von Dehnungsrezeptoren freigesetzt. Speicherform ist ein Prekursor mit einer Kettenlänge von 126 Aminosäuren, deshalb wird ANP auch mit der Zählung (99-126) aufgeführt. Die Effekte, die von ANP ausgelöst werden, wirken der Ursache der Freisetzung, d.h. der erhöhten Volumenbelastung entgegen. ANP steigert die renale Natrium- und Wasserausscheidung durch Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate und Hemmung der tubulären Rückresorption von Na^+ -Ionen. Auf das Gefäßsystem hat ANP eine vasodilatierende Wirkung (s. Abbildung 4). Die Inaktivierung des Hormons erfolgt durch NEP durch die Spaltung der Cys^{105} - Phe^{106} -Bindung unter Aufhebung der Ringstruktur, die durch die Sulfidbrücke Cys^{105} - Cys^{121} gebildet wurde.

Durch die Verlängerung der Wirkung von endogenem ANP leitete sich die mögliche Anwendung von NEP-Inhibitoren als neuartige Diuretika bzw. Antihypertonika ab. Nach Versuchen an verschiedenen Hypertonie-Tiermodellen mit NEP-Inhibitoren wurden insbesondere mit Candoxatril klinische Studien durchgeführt, die eine diuretische und natriuretische Wirksamkeit belegten. Da aber keine signifikante Blutdrucksenkung durch NEP-Inhibitoren zu erzielen war, verursacht durch einen kompensatorischen Anstieg des Angiotensin-II-Spiegels, wurde die Entwicklung neuer Arzneistoffe auf die Erforschung dualer NEP-ACE-Inhibitoren verlagert (s. Abbildung 4). Als erster Vertreter dieser neuen Arzneistoffklasse wird Omapatrilat (Vanlev®) zugelassen werden. Weitere Substanzen befinden sich bereits in der klinischen Prüfung, wie z.B. Fasidotril oder Sampatrilat (Schwartz et al. 1990, Good et al. 1995, Koehne 1997, Walter et al. 1997, Forssmann et al. 1998, Trippodo et al. 1998, Wallis et al. 1998, Laurent et al. 2000, Rouleau et al. 2000, Böhm 2001).

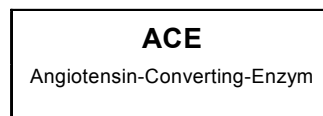
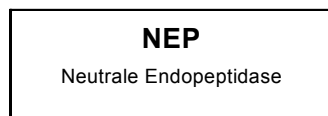
1.3.2 ACE (EC 3.4.15.1)

Das bekannteste Enzym der drei in dieser Arbeit untersuchten Metallopeptidasen ist ACE, es katalysiert vorrangig die Abspaltung von Dipeptiden vom C-terminalen Ende des Substrates. Die pharmakologisch bedeutendste Funktion ist die Bildung des potenten Vasokonstriktors Angiotensin II aus dem Dekapeptid Angiotensin I innerhalb des blutdruck-regulierenden Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (s. Abbildung 4). Die Hemmung von ACE bedingt die Verminderung der Angiotensin-II-Bildung mit

nachfolgender Gefäßdilatation und Blutdrucksenkung. ACE-Inhibitoren haben einen festen Platz in der Behandlung von Hypertonie und Herzinsuffizienz. Nach dem ersten ACE-Hemmer Captopril wurden neue Substanzen mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften entwickelt und in die Therapie eingeführt.

Die Beeinflussung des Blutdruckes erfolgt vor allem durch das ACE der Gefäßendothelzellen, andere Verbreitungsschwerpunkte sind Niere, Lunge und ZNS. Dort besitzt das Enzym die Funktion der Angiotensin-II-Bildung und der Inaktivierung von Bradykinin und Enkephalinen. Neben dem zellständigen ACE, dem Ektoenzym, existiert eine humorale Form, deshalb sind hohe ACE-Aktivitäten auch im Serum, in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Seminalplasma nachweisbar. Die lösliche Form des Enzyms entsteht durch proteolytische Prozesse aus dem Ektoenzym. Im Unterschied zu NEP und LAP besitzt ACE zwei aktive Zentren mit dem zinkbindenden Motiv der Gluzincin-Metallopeptidasen. Beide Zentren arbeiten unabhängig voneinander und unterscheiden sich in ihrer Affinität zu einzelnen ACE-Inhibitoren und in der Abhängigkeit ihrer Aktivität von der Chloridionen-Konzentration. Das germinale ACE dagegen stellt eine Isoenzym des somatischen Enzyms mit nur einem aktiven Zentrum dar. Neben der gut untersuchten Beeinflussung vasoaktiver Peptide greift ACE auch in Prozesse des Immunsystems, der Fortpflanzung und Angiogenese ein, wobei noch viele Zusammenhänge ungeklärt sind, insbesondere die Rolle der beiden aktiven Zentren (Siems und Halle 1982, Skidgel et al. 1987, Williams et al. 1996, Förstermann 2001, Lingham et al. 1990, Volpert et al. 1996).

Enzym:



Funktion:

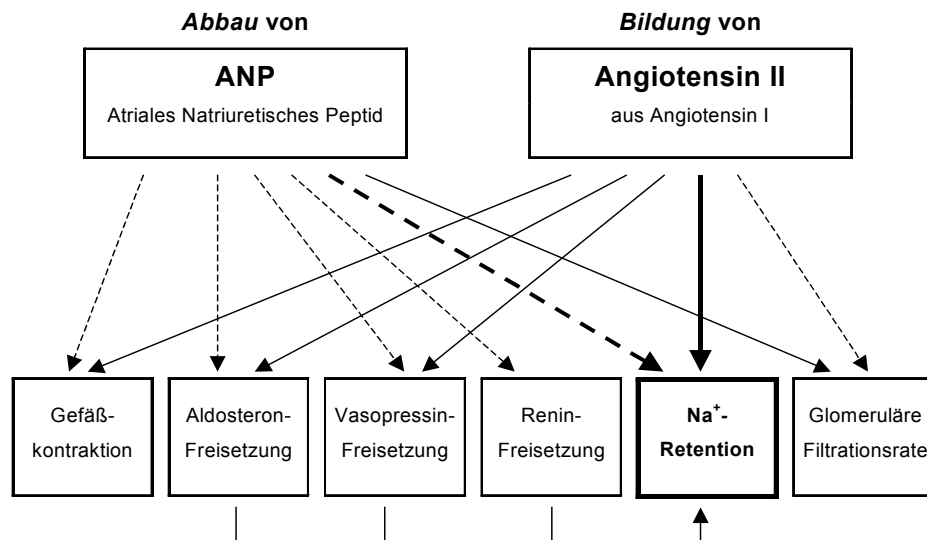


Abbildung 4: Pharmakologische Beziehungen von NEP und ACE, unter Hervorhebung der Effekte auf die Na⁺-Retention bzw. Harnausscheidung

—————> Steigerung - - - - -> Absenkung

Die Effekte von ANP und Angiotensin II sind gegensätzlich. Eine Hemmung der Enzyme NEP und ACE bedeutet Wirkungsverstärkung von ANP und Verminderung der Angiotensin-II-Effekte. Resultat ist eine geringere Na-Rückresorption am spätdistalen Tubulus und Sammelrohr, verbunden mit erhöhter Wasserausscheidung (Diurese).

1.3.3 LAP (EC 3.4.11.2)

Die Leucin-Aminopeptidase, auch als Aminopeptidase N oder M und Membran-Alanyl-Aminopeptidase bezeichnet, besitzt im Vergleich zu NEP und ACE die geringste Substratspezifität. Das Enzym spaltet wie alle Aminopeptidasen einzelne Aminosäuren von der N-terminalen Seite des Substrates ab und bevorzugt dabei neutrale Aminosäuren. LAP wird von einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen exprimiert, ist aber in Niere, Leber und Darm besonders angereichert. Im ZNS hat LAP, wie auch NEP, u.a. die Funktion der Enkephalin-Inaktivierung. Als weitere Substrate seien Substanz P, Cholecystokinin, Somatostatin, der chemotaktische Faktor f-Met-Leu-Phe

aufgeführt. LAP entspricht dem CD13-Antigen und befindet sich an der Oberfläche verschiedenener Zelltypen während der Hämatopoese und dient somit als enzymatischer Marker von bestimmten Leukämieformen.

Die Wirkung vieler Inhibitoren von Aminopeptidasen, wie z.B. Bestatin und Amastatin, sind nicht auf ein Enzym beschränkt. Daher ist die Suche nach selektiven Inhibitoren eine wichtige Forschungsaufgabe. Ziel ist dabei weniger die Entwicklung von Arzneistoffen, sondern immer noch die Aufklärung der physiologischen bzw. pathophysiologischen Rolle einzelner Enzyme. Gegen die Anwendung von LAP-Inhibitoren als Pharmaka spricht vor allem die geringe Spezifität des Enzyms, so konnten sich, bis auf die Anwendung von Bestatin als Zytostatikum (s. Kapitel 3.5), noch keine weiteren Anwendungsgebiete herauskristallisieren (Taylor 1993, Wang und Cooper 1996, Vlahovic und Stefanovic 1998, Schalk et al. 1994).

1.4 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkungsweise der traditionellen europäischen Droge Birkenblätter auf den verschiedenen Betrachtungsebenen der Phytopharmakaforschung zu untersuchen. Nach molekular-pharmakologischen *In-vitro*-Testungen sollte die Resorption von Birkeninhaltsstoffen untersucht werden. Abschließende Aufgabe war die Überprüfung der pharmakologischen Wirksamkeit der Droge als angewandtes Arzneimittel in einer Pilotstudie.

Phytochemisch war die Droge bereits zu Beginn der Arbeit gut untersucht, das genaue Flavonoidspektrum bekannt und die Strukturen der enthaltenen Triterpenverbindungen aufgeklärt. Ebenso war durch Tierversuche eine aquaretische Wirkung belegt worden.

Durch molekular-pharmakologische Untersuchungen mit Drogenextrakten und daraus gewonnenen Fraktionen sollte ein Bindeglied zwischen den beiden Forschungsansätzen Isolation bzw. Strukturaufklärung von Naturstoffen und Wirkungsnachweis des Phytopharmakons hergestellt werden.

Als mögliche Angriffspunkte für Pflanzeninhaltsstoffe sind Enzyme zu betrachten, deren Hemmungen zur Verschiebung des Gleichgewichts zwischen regulatorischen Peptidhormonen führen. Aufgrund der Anwendung der Birkenblätter als harntreibende Arzneidroge wurde die Neutrale Endopeptidase als Testsystem für eine bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung ausgewählt. Inhibitoren dieses Enzyms bewirken durch Anstieg der Konzentration an Atriale Natriuretischen Peptid eine gesteigerte Harnausscheidung. Als Arbeitshypothese wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Wirksamkeit der traditionellen Arzneidroge Birkenblätter auch auf diesen Wirkmechanismus zurückzuführen sein könnte.

Da bei der Entwicklung und der pharmakologischer Testung von synthetischen Inhibitoren der Metallopeptidasen eng verwandte Enzyme gemeinsam untersucht werden, wurden auch in dieser Arbeit die Testungen auf zwei weitere Metallopeptidasen (Angiotensin-Converting-Enzym und Leucin-Aminopeptidase) ausgeweitet. Entscheidend für die Enzymauswahl war ebenfalls das

physiologische Zusammenwirken von NEP und ACE bei der Regulation von Blutdruck und Wasserhaushalt (s. Abbildung 4).

In-vitro-Testungen sind effektive Screeningmethoden auf der Suche nach Wirkstoffen. Für die Übertragung der Ergebnisse auf *In-vivo*-Bedingungen müssen jedoch Fragestellungen zur Bioverfügbarkeit der aktiven Verbindungen geklärt werden. Gerade für Naturstoffe wurde die Bedeutung von Absorption, Verteilung und Umwandlung im Körper erst in neuerer Zeit erkannt. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb an einem *In-vitro*-Perfusionsmodell das Absorptionsverhalten von Hyperosid, dem Hauptflavonoid der Birkenblätter, sowie der Einfluss der Applikation eines Birkenblätterextraktes auf die Absorption von Hyperosid untersucht werden.

Mit der 5. Novelle des AMG II (1994) werden für die Nachzulassung von Arzneimitteln Wirksamkeitsnachweise gefordert, alternativ kann ein Präparat vom Hersteller als „traditionell“ eingestuft werden, gleichbedeutend mit dem Verzicht auf die Apothekenpflicht und Einschränkungen zur Indikationsangabe. Von diesen Regelungen sind insbesondere auch Phytopharmaka betroffen. Für viele Drogen und Zubereitungen wird nun versucht, durch klinische Studien eine Wirksamkeit zu belegen. Auch bei dieser Problematik ist die Birke eine typische Arzneipflanze, obwohl seit Jahrhunderten traditionell angewendet, fehlt bis zum jetzigen Zeitpunkt der klinische Wirksamkeitsnachweis. Deshalb sollte in einer Pilotstudie der Effekt von Birkenblättertee im Vergleich zu Wasser auf das Harnvolumen und den zeitlichen Verlauf der Ausscheidung untersucht werden.

2 ERGEBNISSE

2.1 Effekte von Birkenblätterextrakten auf die Aktivität von Metallopeptidasen

2.1.1 Herstellung und phytochemische Charakterisierung der Extrakte

Unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten wurden aus den getrockneten Blättern von *Betula pendula* Roth, die mit 2,2 % Gesamtflavonoidgehalt den Anforderungen des Arzneibuches entsprachen, Extrakte gewonnen. Einerseits wurde sich an der praktischen Anwendung der Droge als Aufguss orientiert und das Pflanzenmaterial mit siedendem Wasser extrahiert (Heißwasserextrakt, HWExtr), andererseits wurde ein Verfahren zur Anreicherung glykosidischer Verbindungen (Al-Tawha 1997) durch stufenweise Extraktion des Pflanzenmaterials mit Lösungsmitteln abnehmender Lipophilie und steigender Polarität eingesetzt. Hierbei wurde nach Entfettung der Droge mit Petrolether ein Ethylacetatextrakt (EthacExtr.) und ein Extrakt mit 80%igem Methanol (MeOHExtr.) hergestellt.

Eine erste phytochemische Charakterisierung nach DC der Extrakte (s. Kapitel 4.4) ließ sich wie folgt zusammenfassen:

Tabelle 1: Zusammenfassung von DC der verschiedenen Birkenblätterextrakte

	Hyperosid	Quercetin	Triterpene
Fließmittel	I	II	IV
Detektion	Naturstoffreagenz	Naturstoffreagenz	Anisaldehyd-Reagenz
HWExtr.	+	-	-
EthacExtr.	+	+	+
MeOHExtr.	+	-	-

+ enthalten, - nicht erkennbar, Methoden s. Kapitel 4.4

Von dem HWExtr. wurde analog zur Ausgangsdroge der Gesamtflavonoidgehalt nach Arzneibuch bestimmt. Mit 3,7 % lag ein höherer Gehalt als in der Ausgangsdroge vor, der Vergleich mit dem Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV 4,8 : 1) ergab, dass keine vollständige Flavonoidextraktion der Droge mit Wasser erzielt wurde.

Mittels HPLC wurde das Flavonoidspektrum der Extrakte untersucht und der Gehalt des Hauptflavonoids Hyperosid bestimmt. Neben Hyperosid konnten die Quercetinglykoside Quercetin-3-glucuronid, Guajaverin und Quercitrin über Vergleich der Chromatogramme von Referenzsubstanzen identifiziert werden. Den Literaturangaben folgend (Schneider-Leukel 1994, Keinänen et al. 1998), ließen sich zwei weitere Peaks anhand ihres Retentionsverhaltens an RP-18-Phasen im Vergleich zu den anderen Flavonolglykosiden Myricetin-3-galactosid bzw. Avicularin zuordnen.

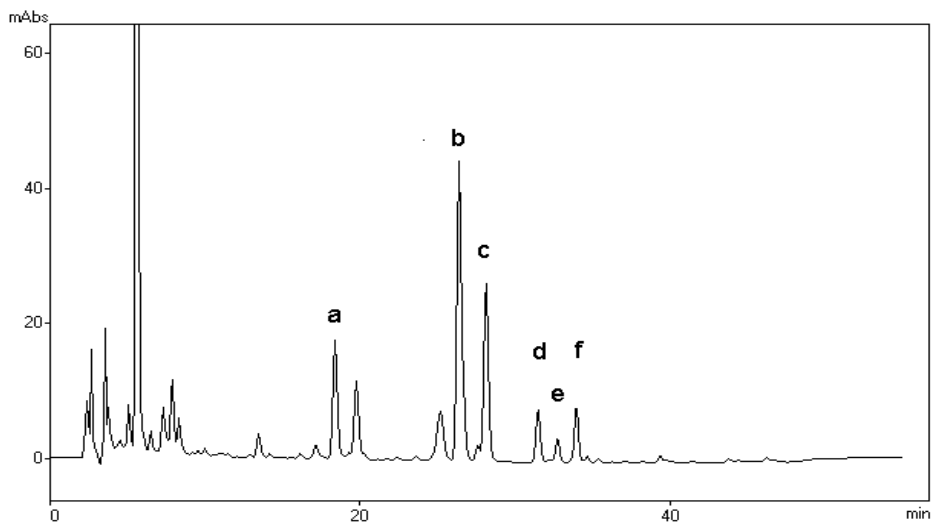


Abbildung 5: HPLC-Chromatogramm des Heißwasserextraktes

a: Myr-gal, **b:** Hyperosid, **c:** Q-glucA, **d:** Guajaverin, **e:** Avicularin, **f:** Quercitrin. Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5µm) 250-4, 30°C, Flussrate: 1 ml/min, Fließmittel A: 90%(V/V) 0,45N H₃PO₄; 10%(V/V) ACN, Fließmittel B: 10%(V/V) 0,45N H₃PO₄; 90%(V/V) ACN, Gradient: 0 min 5% B, 40 min 40% B, 45 min 5% B, Detektion: 254 nm

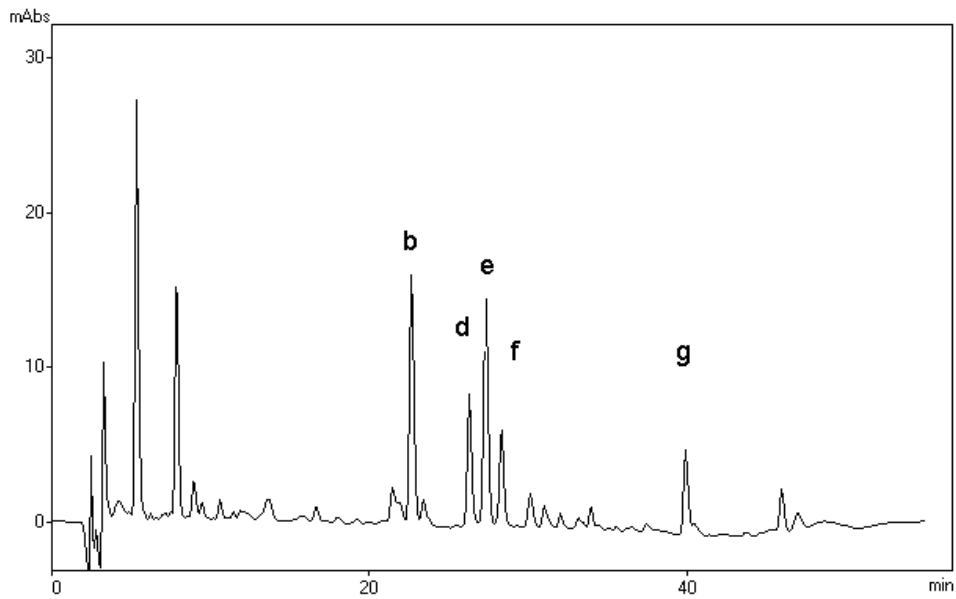


Abbildung 6: HPLC-Chromatogramm des Ethylacetatextraktes

b: Hyperosid, **d:** Guajaverin, **e:** Avicularin, **f:** Quercitrin, **g:** Quercetin. Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5µm) 250-4, 30°C, Flussrate: 1 ml/min, Fließmittel A: 90%(V/V) 0,45N H₃PO₄; 10%(V/V) ACN, Fließmittel B: 10%(V/V) 0,45N H₃PO₄; 90%(V/V) ACN, Gradient: 0 min 5% B, 40 min 40% B, 45 min 5% B, Detektion: 254 nm

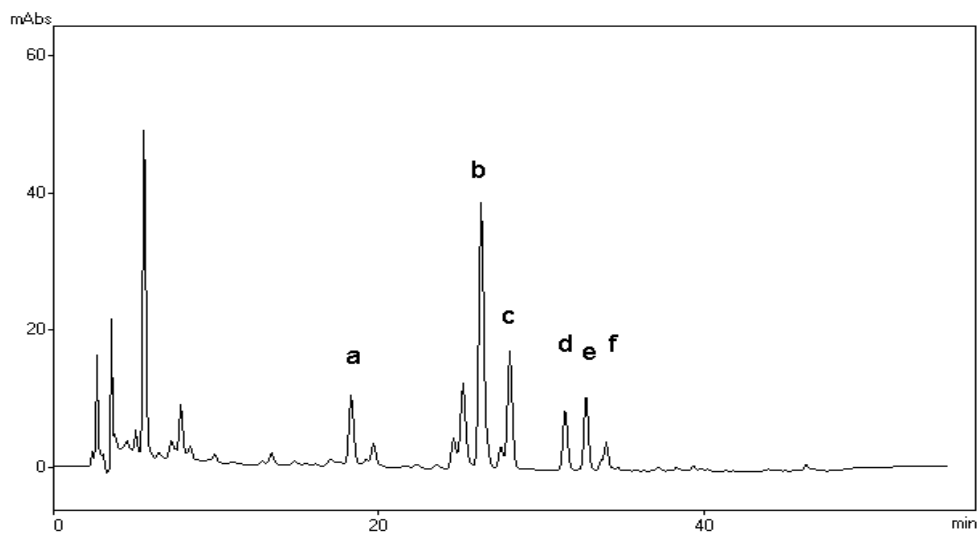


Abbildung 7: HPLC-Chromatogramm des 80%Methanol-Extraktes

a: Myr-gal, **b:** Hyperosid, **c:** Q-glucA, **d:** Guajaverin, **e:** Avicularin, **f:** Quercitrin. Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5µm) 250-4, 30°C, Flussrate: 1 ml/min, Fließmittel A: 90%(V/V) 0,45N H₃PO₄; 10%(V/V) ACN, Fließmittel B: 10%(V/V) 0,45N H₃PO₄; 90%(V/V) ACN, Gradient: 0 min 5% B, 40 min 40% B, 45 min 5% B, Detektion: 254 nm

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Hyperosidbestimmungen in den Extrakten aufgeführt. Mit 80%igem Methanol wurde das Flavonoid erwartungsgemäß am stärksten angereichert, da beim geringsten Droge-Extrakt-Verhältnis der höchste Gehalt bestimmt wurde.

Tabelle 2: Hyperosidgehalt der Birkenblätterextrakte (HPLC)*

	DEV	Hyperosid (%)
HWExtr.	4,8 : 1	3,4 ± 0,28
EthacExtr.	8,5 : 1	1,1 ± 0,07
MeOHExtr.	4,2 : 1	6,2 ± 0,43

* Methode s. Abbildung 5, n≥5

2.1.2 Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch Extrakte

Die Effekte der Extrakte auf die Enzyme wurden zunächst im Konzentrationsbereich von 1,25 mg/ml bis 0,1 mg/ml untersucht (s. Tabelle 3).

Der wässrige Extrakt hemmte die Aktivität von NEP und ACE in der maximalen Konzentration über 50 %, auf LAP konnte keine Beeinflussung registriert werden. Für den Ethylacetatextrakt konnte für NEP eine IC₅₀ von 0,40 mg/ml bestimmt werden, ACE wurde in den höheren Konzentrationen etwa zu 20 % gehemmt. Für LAP wurden auch bei diesem Extrakt keine Interaktionen festgestellt. Der methanolische Extrakt erwies sich als stärkster Inhibitor für alle drei Metallopeptidasen. Für NEP wurden die Konzentrationen an Extrakt in den Untersuchungen bis auf 5 µg/ml verringert und für den methanolischen Extrakt wurde eine IC₅₀ von 55 µg/ml berechnet.

Tabelle 3: Beeinflussung von NEP, ACE und LAP durch Birkenblätterextrakte

Extraktkonzentration in mg/ml		Enzymhemmung in %		
		HWExtr.	EthacExtr.	MeOHExtr.
NEP:	1,25	56 <i>R=8</i>	88 <i>R=10</i>	100 <i>R=6</i>
	1,0	49 <i>R=6</i>	72 <i>R=4</i>	n.b.
	0,5	34 <i>R=4</i>	61 <i>R=10</i>	98 <i>R=6</i>
	0,1	12 <i>R=6</i>	18 <i>R=12</i>	70 <i>R=8</i>
ACE:	1,25	57 <i>R=4</i>	25 <i>R=11</i>	54 <i>R=7</i>
	1,0	49 <i>R=10</i>	n.b.	n.b.
	0,5	36 <i>R=3</i>	23 <i>R=6</i>	23 <i>R=17</i>
	0,1	k.H.	k.H.	k.H.
LAP:	1,25	k.H.	k.H.	79 <i>R=3</i>
	1,0	n.b.	n.b.	71 <i>R=4</i>
	0,5	n.b.	n.b.	56 <i>R=3</i>
	0,1	n.b.	n.b.	k.H.

n.b.: nicht bestimmt; k.H.: keine Hemmung, Methoden s. Kapitel 4.8, n≥4

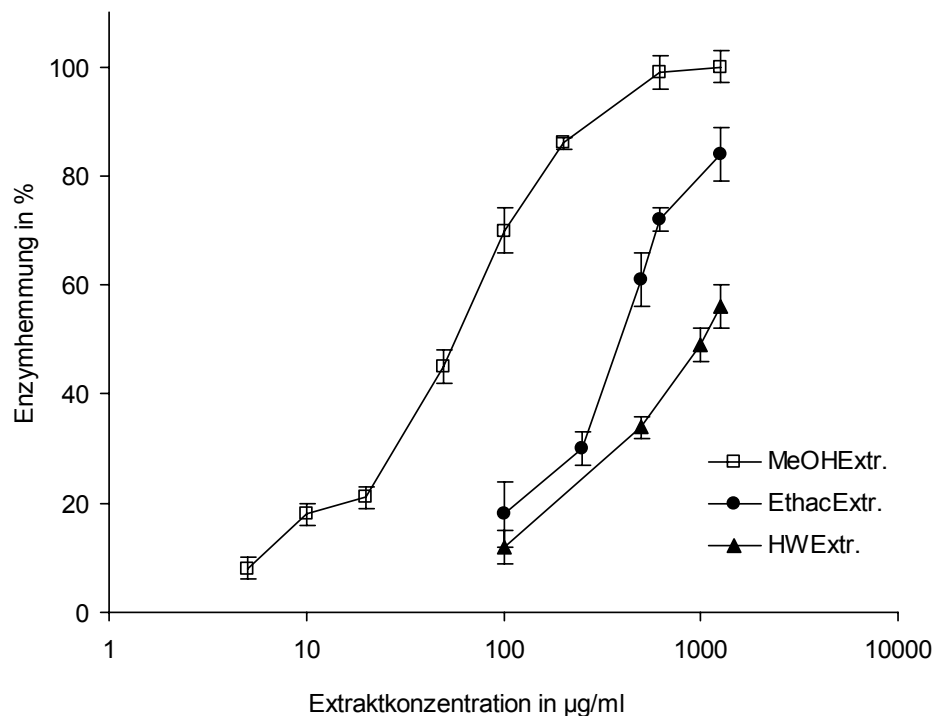


Abbildung 8: Beeinflussung der Aktivität der NEP durch verschiedene Birkenblätterextrakte (Konzentration 5 - 1250 µg/ml, $n \geq 4$, Methode s. Kapitel 4.8.3)

2.1.3 Auftrennung des methanolischen Extraktes und Beobachtung der NEP-Beeinflussung durch die hergestellten Fraktionen

Da der methanolische Extrakt die Enzyme am stärksten hemmte, wurde zunächst ein Teil dieses Extraktes weiter aufgetrennt, um die für die Wirkung verantwortlichen Komponenten herauszufinden. Hierbei wurde wieder nach dem Prinzip von Al-Tawha (1997) verfahren. Nach der Aufnahme des Extraktes in Wasser wurden durch Ausschütteln mit n-Butanol stärker polare Verbindungen von Glykosiden getrennt. Mittels DC wurde das Trennverfahren hinsichtlich des Verbleibs der Flavonoide kontrolliert. Die anschließende Etherfällung diente der Abtrennung restlicher apolarer Begleitstoffe, Ergebnis dieses Aufreinigungsprozesses war ein pulveriges, flavonoidreiches Rohglykosidgemisch.

Tabelle 4: NEP-Hemmung (%) der eingeeengten Phasen bei der Gewinnung des RGG

Konzentration in µg/ml	MeOHExtr. (Vgl.) DEV 4,2 : 1	Butanolphase DEV 12 : 1	wässrige Phase DEV 7,2 : 1	RGG DEV 22 : 1
200	86	94	83	95
100	73	82	68	81
50	45	64	51	65
10	16	23	20	4

Methode s. Kapitel 4.8.3, n≥2

Die Untersuchungen hinsichtlich der NEP-Beeinflussung zeigten, dass trotz der Reinigungsschritte keine Zunahme der inhibitorischen Eigenschaften zu beobachten war. Die Hemmung des RGG verblieb in der gleichen Größenordnung wie die des methanolischen Extraktes.

Um zu überprüfen, welchen Anteil die Flavonoide an der Gesamtwirkung des methanolischen Extraktes bzw. des RGG besaßen, wurde das RGG mittels Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 aufgetrennt und das Eluat hinsichtlich des Flavonoidspektrums in Fraktionen aufgeteilt (s. Kapitel 4.5.1). Durch HPLC wurden in den Fraktionen die Flavonoide identifiziert (Tabelle 5), sowie durch Enzymbestimmungen die NEP-Hemmwirkungen kontrolliert (Tabelle 6).

Tabelle 5: Charakterisierung der Flavonoid-Fraktionen der SC (Sephadex LH-20) des RGG

	Zuordnung durch DC	Flavonoididentifizierung durch HPLC
C	Chlorogensäure	Chlorogensäure
D	Hyperosid	Hyperosid, gut aufgereinigt
E	3 Flavonoide	Myr-gal > Hyperosid > Guajaverin
F	2 Flavonoide	Myr-gal > Q-glucA
G	2 Flavonoide	Q-glucA > Myr-gal
H	1 Flavonoid	Mischung aus 4 Flavonoiden: Myr-gal + 2x unbekannt + Q-glucA

Methoden DC s. Kapitel 4.4, HPLC s. Kapitel 4.7

Tabelle 6: NEP-Hemmung (%) durch Fraktionen des RGG nach SC (Sephadex LH-20)

	Konzentration in µg/ml:			
	200	100	50	10
A	52	26	n.b.	n.b.
B	43	20	n.b.	n.b.
C	84	62	35	11
D	74	52	29	8
E	74	55	31	13
F	90	77	47	19
G	87	71	53	19
H	91	78	65	31
J	100	96	88	48

n.b.: nicht bestimmt, Methode s. Kapitel 4.8.3, n≥2

Die Auswertung der NEP-Testungen ergab, dass durch die Säulenchromatographie keine exakte Trennung aktiver und nicht aktiver Verbindungen erzielt werden konnte. Die flavonoidreichen Fraktionen **D - H** hemmten das Enzym stärker als die Vorfraktionen **A** und **B**. Besonders auffällig war allerdings die starke Wirkung der Fraktion **J**, die im Anschluss an die Flavonoide von der Säule eluiert wurde. Aufgrund dieser Tatsache wurden nun die Untersuchungen in zwei Richtungen fortgeführt. Zum einen wurden Enzymtestungen mit reinen Flavonoiden durchgeführt (s. Kapitel 2.2.1), da dieses effektiver erschien, als die bereits bekannten Flavonoide der Birkenblätter aus den Fraktionen der Säulenchromatographie selbst weiter zu isolieren. Zum anderen war die Fragestellung zu klären, zu welcher Stoffklasse sich der Inhalt des sogenannten Nachlaufes einordnen lassen konnte.

2.1.4 Untersuchung zur wirksamsten Fraktion des methanolischen Extraktes

Die eingeeengte Fraktion **J**, sowie deren Lösung in Methanol besaßen eine dunkle rotbraune Färbung. Nach der DC und der Detektion mit Naturstoffreagenz handelte es sich um eine flavonoidfreie Fraktion, dagegen ergab die Vanillin-Phosphorsäure-Detektion eine positive Reaktion, d.h. eine Rotverfärbung des Substanzfleckes, die auf das Vorkommen von Proanthocyanidinen schließen ließ.

Der Einsatz verschiedener DC-Laufmittel zeigte, dass ein schwer zu trennendes Stoffgemisch vorlag, dessen Laufverhalten stark pH-abhängig war. In keinem Fall konnten Banden mit scharfen R_F -Werten erhalten werden (Tabelle 34 und Tabelle 35, S.93).

Mit der Fraktion **J** wurde nicht weitergearbeitet, da diese durch den Extraktionsprozess erhalten wurde, der nicht auf die Isolation von Proanthocyanidinen ausgerichtet war. Da Proanthocyanidine sehr leicht oxidieren und zur Polymerisation neigen, wurde direkt das Ausgangsmaterial Birkenblätter und der methanolische Extrakt auf das Vorkommen von Gerbstoffen untersucht, so wie deren Einfluss auf die Metallopeptidasen überprüft.

2.1.5 Gerbstoffeigenschaften von Birkenblättern und Birkenblätterextrakten

Nach der Hautpulvermethode des Arzneibuches (s. Kapitel 4.3.2) wurde für die getrocknete Droge ein Gerbstoffgehalt von 4,51 % ermittelt. Entsprechend dem DEV wurde für die äquivalente Menge methanolischen Extraktes ein Gehalt von 21,1 % bestimmt. Damit wurde nachgewiesen, dass schon in der Droge Polyphenole, die an Hautpulver binden und Wolframatophosphorsäure reduzieren, enthalten waren. Durch die Behandlung mit 80%igem Methanol wurden diese Verbindungen um fast das fünffache angereichert.

Auch über DC sollte zusätzlich zur Gerbstoffbestimmung das Vorhandensein von Proanthocyanidinen in der Ausgangsdroge kontrolliert werden. Einerseits wurden die Birkenblätter der Identitätsprüfung von Tormentillwurzelstock (DAB 1999) unterzogen. In dem frisch hergestellten Extrakt konnte Catechin nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu konnte im methanolischem Extrakt kein Catechin-Monomer mehr gefunden werden. Andererseits wurde nach

Hiermann et al. (1986) die Droge schonend mit einer Aceton-Wasser-Mischung extrahiert (s. Kapitel 4.2.4). Mit speziell für OPC bzw. PPC entwickelten Laufmitteln wurden die DC des Extraktes durchgeführt. Im Aceton-Wasser-Extrakt konnten neben den dominierenden Banden von Flavonoiden bei allen Fließmitteln auch rötliche, Proanthocyanidinen entsprechende Zonen über die gesamte Laufstrecke detektiert werden (s. Kapitel 4.6.2).

Der Aceton-Wasser-Extrakt wurde ebenfalls auf seine NEP-Beeinflussung überprüft. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 7: NEP-Hemmung durch den Aceton-Wasser-Extrakt im Vergleich zum MeOHExtr.

Konzentration in µg/ml	Aceton-Wasser-Extrakt	MeOHExtr. (Vgl. Tabelle 3)
	DEV 3,4 :1	DEV 4,2 : 1
500	95	98
200	n.b.	86
100	53	73
50	34	45
10	10	16

n.b.: nicht bestimmt, Methode s. Kapitel 4.8.3, n≥2

2.1.6 Orientierende Versuche zum Vergleich der Enzymhemmungen vor und nach Hautpulverbehandlung

Die Gerbstoffe, die in Birkenblättern enthalten waren, wurden bei den hergestellten Extrakten mit den Lösungsmitteln Wasser und 80%iges Methanol aus dem Pflanzenmaterial ausgezogen (s. Kapitel 2.1.1). Deshalb wurden nun für HWExtr. und MeOH-Extr. in Konzentrationen im Bereich der IC₅₀ der unbehandelten Extrakte die NEP-Testungen wiederholt, wobei Stammlösungen der Extrakte zuvor mit Hautpulver versetzt wurden.

Tabelle 8: NEP-Hemmung durch Extrakte vor und nach Hautpulverbehandlung

	Konzentration	NEP-Hemmung in %	
	in µg/ml	ohne Behandlung	nach Hautpulverbehandlung
MeOHEXtr.	200	87	23
	100	74	11
	50	58	8
HWExtr.	1250	60	39
	500	44	19

Methode s. Kapitel 4.8.4, n≥2

Ein Vergleich der Hemmwirkungen mit und ohne Hautpulverbehandlung zeigte bei beiden Extrakten deutlich, dass die Senkung der Enzymaktivität von Substanzen verursacht wurde, die an Hautpulver adsorbiert wurden.

2.1.7 Fraktionierung des Ethylacetatextraktes und Beobachtung der NEP-Beeinflussung der hergestellten Fraktionen

Die Aktivität des Ethylacetatextraktes auf die Metallopeptidasen nahm eine Zwischenstellung zwischen methanolischem und wässrigem Extrakt ein. Nur im EthacExtr. konnten durch DC Triterpene nachgewiesen werden. Als Referenzsubstanzen standen die von Rickling und Glombitza (1993) isolierten drei Dammaranester zur Verfügung. Auf den Laufhöhen dieser Dammaranester konnten im eigenen Extrakt Triterpene detektiert werden. Im Extrakt wurden zusätzlich weitere Triterpene mit ähnlichen R_F -Werten detektiert (s. Kapitel 4.5.2). In dem noch unaufgereinigtem Extrakt befanden sich demzufolge diverse strukturverwandte Verbindungen. Neben den vorhandenen Dammaranestern 1-3 wurden von Hilpisch et al. (1997) inzwischen sechs weitere, mit Malonsäure veresterte Dammaranverbindungen aus Birkenblättern isoliert, die sich strukturell von den Referenzsubstanzen nur durch die Positionen der Doppelbindungen und OH-Gruppen an der Seitenkette C_{20} - C_{27} unterscheiden.

Die Aufreinigung des EthacExtr. durch eine erste Säulenchromatographie an Kieselgel diente vor allem der Chlorophyllabtrennung (s. Kapitel 4.5.2). Die Ergebnisse der Testungen der gebildeten Fraktionen auf NEP-Hemmaktivität wurden in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 9: Effekte der EthacExtr.-Fraktionen nach SC (Kieselgel) im NEP-Assay

	Konzentration in µg/ml	I_{Ges} (%)	I_{LAP} (%)	I_{NEP} (%)*	Charakterisierung
1-8	500	63	32	46	chlorophyllhaltig
	100	27	10	19	
9-14	500	49	34	23	gelbe Farbstoffe
	100	12	5	7	
15-17	500	41	27	19	Zwischenfraktion
	100	6	2	4	
18-22	500	78	60	45	Chlorophyll
	100	16	2	14	
23-30	500	93	86	50	Triterpene (+ Chlorophyll)
	100	29	35	<0	
31-41	500	91	85	40	Triterpene (+ Flavonoid)
	100	21	24	<0	
42-47	500	95	87	62	Flavonoide
	100	50	54	<0	

* berechnet, Methode s. Kapitel 4.8.3, $n \geq 2$

Bei allen Fraktionen wurden in der hohen Konzentration von 500 µg/ml sowohl NEP- als auch LAP-Reaktion gehemmt. Sogar die Chlorophyllfraktionen zeigten diese Interaktionen mit den Enzymen bei dieser Bestimmungsmethode.

Weiter aufgearbeitet wurde die Fraktion (23-30), da hier nach Beurteilung der Chromatogramme bei Gleichheit der aufgetragenen Fraktionsmengen das günstigste Verhältnis von Triterpenen zu anderen Inhaltsstoffen vorlag.

Eine zweite Säulenchromatographie an Kieselgel wurde durchgeführt. Aus dem aufgegebenen Material resultierten sechs Fraktionen, in denen Triterpene angereichert wurden. Eine genaue Zuordnung zu den Vergleichssubstanzen war mittels DC aufgrund der immer noch auftretenden Bandenbreite nicht möglich. Drei Hauptzonen wurden detektiert, wobei Zone 1 in *D-F*, Zone 2 in *G* und *H*, sowie Zone 3 in *F-J* vertreten war. *G* und *H* waren nach der DC die reinsten der Triterpenfraktionen (s. Kapitel 4.5.2, Tabelle 39).

Alle erhaltenen Fraktionen wurden wieder auf ihre NEP-Hemmaktivität untersucht.

Tabelle 10: Effekte der Fraktionen aus (23-30) nach 2. SC (Kieselgel) im NEP-Assay

	Konzentration in µg/ml	I_{Ges} (%)	I_{LAP} (%)	I_{NEP} (%)*	Charakterisierung
A	250	5	k.H.	5	Vorlauf
	100	2	k.H.	2	
B	250	38	17	25	2 Chlorophylle
	100	20	6	15	
C	250	86	76	42	Chlorophyll + unbekannt
	100	48	49	<0	
D	250	75	68	22	Triterpen (+ Chlorophyll)
	100	18	35	<0	
E	250	86	79	33	Triterpen (+Chlorophylle)
	100	63	65	<0	
F	250	77	69	26	Triterpene (+Chlorophylle + fluoresz. Substanz)
	100	6	4	2	
G	250	75	64	31	Triterpene
	100	9	7	2	
H	250	81	71	34	Triterpene
	100	29	40	<0	
J	250	90	76	58	Triterpen (+ Quercetin)
	100	52	29	32	
K	250	92	80	60	Quercetin
	100	75	68	22	
L	250	86	72	50	Quercetin
	100	30	16	18	

* berechnet, k.H.: keine Hemmung, Methode s. Kapitel 4.8.3, n≥2

Bis auf die ersten beiden Fraktionen beeinflussten alle anderen Fraktionen in der höheren Testkonzentration von 250 µg/ml sowohl NEP- als auch LAP-Reaktion.

Erst mit dem Auftreten des Flavonoids stiegen die Hemmwerte in den chlorophyllfreien Fraktionen auch für die geringere Konzentration von 100 µg/ml an.

Im Vergleich zu dem Ausgangsmaterial EthacExtr., der bei 500 µg/ml eine NEP-Hemmung von 61 % (R=10) und bei 100 µg/ml von 18 % (R=12) zeigte (s. Tabelle 3, S.18), bedeutete die Anreicherung von Triterpenen keine Aktivitätszunahme. So ergab die Summe der saubersten Fraktionen G und H, mit denen man weiterarbeiten könnte, ein DEV von 155 : 1. Im Vergleich zum EthacExtr. mit einem DEV von 8,5 : 1 wurden die Verbindungen 18fach angereichert. Theoretisch müsste danach, bei additiven Eigenschaften der potentiellen Enzyminhibitoren, die Hemmwirkung des Extraktes von 500 µg/ml bei 100 µg/ml Fraktion sicher erreicht werden. Dieser Effekt war nicht zu beobachten.

Der Literatur waren keine Angaben zum Triterpengehalt der Birkenblätter zu entnehmen. Angesichts des eingesetzten Drogenmaterials von 300 g bei Rickling und Glombitza (1993) und besonders von 12 kg bei Hilpisch et al.(1997) wurde auf die mehrfache Wiederholung der Aufarbeitungsschritte zur präparativen Gewinnung von verschiedenen Dammaranestern für die Testung auf Enzymhemmungen verzichtet.

Da bei den Testungen eine LAP-Hemmung auffällig war, wurde durch DC (Fließmittel **III**, **IV**) überprüft, ob sich Betulinol im EthacExtr. bzw. dessen Fraktion (23-30) befunden hatte (s. Kapitel 2.2.4.2). Aufgrund des sehr unterschiedlichen Retentionsverhaltens von Betulinol und den detektierten Triterpenen, konnte auf das Fehlen von Betulinol im EthacExtr. sowie in allen, durch die SC gewonnenen Fraktionen geschlossen werden (s. Kapitel 4.5.2).

2.1.8 Testung von Extrakten anderer Pflanzen

Im diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst, die mit Extrakten durchgeführt wurden, die aus Goldrute, Weißdorn und Grünem Tee bereitet wurden. Obwohl die Herstellung und die phytochemische Charakterisierung nicht selbst durchgeführt wurden, fügen sich die genannten Pflanzen aufgrund ihrer Indikation als Arzneidrogen oder der positiven Wirkungen auf die Gesundheit der daraus zubereiteten Getränke sehr gut in die Thematik zur Wirkungsweise der Birkenblätter ein. Auch die enthaltenen

Inhaltsstoffe bieten Parallelen zur Birke. Weiterhin ermöglichten Testungen von anderen Extrakten Rückschlüsse auf die Spezifität der mit den Birkenblätterextrakten gefundenen Effekte.

2.1.8.1 *Solidago virgaurea* L.

Gesamtextrakte, saponin- und flavonoidangereicherte Fraktionen aus *Solidago virgaurea* L., die von PD Dr. G. Bader (Humboldt-Universität zu Berlin, Hiller und Bader 1996) zur Verfügung gestellt wurden, wurden auf ihre NEP-Beeinflussung untersucht.

Tabelle 11: Hemmung der NEP durch *Solidago-virgaurea*-Extrakte und -Fraktionen

Bezeichnung	Konzentration in µg/ml	NEP-Inhibition in %
Saponingemisch	200	k.H.
	100	k.H.
Flavonoide und Phenolcarbonsäuren	200	26 R= 4
	100	26 R= 1
Flavonoidgemisch mit Rutin	750	28 R=10
	500	17 R= 3
	200	k.H.
<i>Solidago virg.</i> Extrakt 80 % MeOH	750	38 R= 0
	500	29 R= 0
<i>Solidago virg.</i> Extrakt 96 % MeOH	750	41 R= 4
	500	33 R= 1

k.H.: keine Hemmung, Methode s. Kapitel 4.8.3, n≥4

Das Saponingemisch aus *Solidago virgaurea* L. hemmte in den ausgewählten Konzentrationen von 200 µg/ml und 100 µg/ml die NEP nicht. Die gemeinsam extrahierten Flavonoide und Phenolcarbonsäuren zeigten bei diesen Konzentrationen einen schwachen Effekt. Ebenfalls eine Hemmung über 25 % wurde durch eine aufgereinigte Flavonoidfraktion, aber erst bei höherer Konzentration von 750 µg/ml, erreicht. Mit den Rohextrakten wurden bei 750 µg/ml und 500 µg/ml deutliche Hemmungen beobachtet, die jeweils unter 50 % lagen. Damit ließen sich die beiden Extrakte in ihrer Wirkungsstärke im

Bereich des HWExtr. der Birke einordnen. Höhere Hemmwerte wurden für diesen Birkenblätterextrakt nur bei den eingesetzten höheren Konzentration bis zu 1,25 mg/ml erzielt. Aktiver als die *Solidago*-Extrakte waren EthacExtr. und MeOHExtr. der Birke, allerdings wurde das Birkenmaterial stufenweise mit den Lösungsmitteln extrahiert, bei *Solidago* handelte es sich dagegen um Rohextrakte der Droge mit Methanol.

2.1.8.2 *Crataegus*-sp.

Zwei von der Fa. Schwabe hergestellte Extrakte aus Weißdornblättern wurden auf ihre Eigenschaften bezüglich NEP, ACE und LAP untersucht. Beide Extrakte waren proanthocyanidinreiche Fraktionen, die durch Extraktion mit Methanol bzw. 70 % Aceton gewonnen wurden.

Tabelle 12: Beeinflussung von NEP, ACE und LAP durch *Crataegus*-Extrakte

	Extraktkonzentration	Enzymhemmung in %	
	in µg/ml	<i>Crataegus</i> -Methanol	<i>Crataegus</i> -70%Aceton
NEP:	100	100 <i>R</i> =1	100 <i>R</i> =0
	50	92 <i>R</i> =1	92 <i>R</i> =0
	10	47 <i>R</i> =2	41 <i>R</i> =2
	5	29 <i>R</i> =1	22 <i>R</i> =1
ACE:	200	48 <i>R</i> =4	56 <i>R</i> =9
	100	33 <i>R</i> =3	14 <i>R</i> =1
	50	13 <i>R</i> =4	k.H.
	10	k.H.	k.H.
LAP:	200	90 <i>R</i> =1	95 <i>R</i> =0
	100	78 <i>R</i> =1	92 <i>R</i> =0
	50	48 <i>R</i> =2	84 <i>R</i> =1
	10	k.H.	k.H.

k.H.: keine Hemmung, Methoden s. Kapitel 4.8, $n \geq 4$

Die Größenordnung der Hemmwirkungen auf die Enzyme entsprach der, der Fraktion **J**, die bei der SC des MeOHExtr. der Birkenblätter nach den Flavonoiden eluiert wurde. Die NEP wurde am stärksten beeinflusst (IC_{50} ca. 10 µg/ml), ebenso wurde in der maximalen Konzentration von 200 µg/ml die LAP fast vollständig und das ACE nur zu 50 % gehemmt.

Genau wie bei den Birkenblätterextrakten in Kapitel 2.1.6, wurde eine Lösung der *Crataegus*-Extrakte (400 µg/ml) mit Hautpulver versetzt. Die NEP-Hemmwirkungen der Proben wurden durch diese Behandlung vollständig aufgehoben, d.h. die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe an das Hautpulver gebunden.

Tabelle 13: NEP-Hemmung (%) der *Crataegus*-Extrakte vor und nach Hautpulverbehandlung

Extraktkonzentration in µg/ml	<i>Crataegus</i> -Methanol		<i>Crataegus</i> -Aceton	
	ohne	nach Hautpulverbehandlung	ohne	nach.
50	84	k.H.	90	k.H.
25	71	k.H.	74	k.H.
10	45	k.H.	46	k.H.

k.H.: keine Hemmung, Methode s. Kapitel 4.8.4, $n \geq 2$

2.1.8.3 *Camellia sinensis* (L.)O.Kuntze

Ein auf 15 % Epigallocatechingallat eingestellter Grüntee-Extrakt (EFLA 085942) der Fa. Flachsmann wurde auf seine Effekte in allen drei Enzym-Assays getestet.

Tabelle 14: Beeinflussung von NEP, ACE und LAP durch Grüntee-Extrakt

	Konzentration in µg/ml	Enzymhemmung in %
NEP:	100	82 <i>R</i> = 2
	50	60 <i>R</i> = 3
	10	20 <i>R</i> = 5
	5	12 <i>R</i> = 3
ACE:	500	69 <i>R</i> = 6
	100	30 <i>R</i> = 8
	50	20 <i>R</i> =8
	10	5 <i>R</i> =2
LAP:	500	91 <i>R</i> = 4
	100	51 <i>R</i> =11
	50	35 <i>R</i> = 9
	10	26 <i>R</i> =10

Methoden s. Kapitel 4.8, n≥4

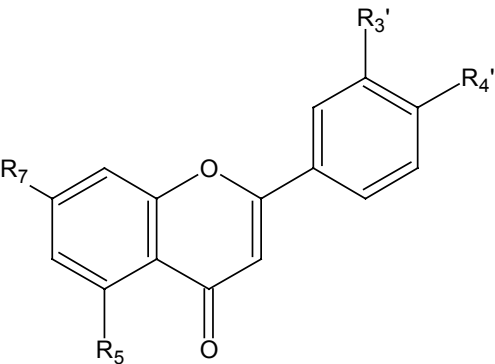
Wie bei Birke und *Crataegus* reagierte die NEP am empfindlichsten auf den Extraktzusatz, bereits bei 100 µg/ml trat eine starke Hemmung ein. Mit einer IC₅₀ bei 40 µg/ml lagen für dieses Enzym die Hemmwirkungen im gleichen Bereich wie für den MeOHExtr. der Birke und die *Crataegus*-Extrakte.

2.2 Effekte von Einzelstoffen auf die Aktivität von Metallopeptidasen

2.2.1 Screening von Flavonoiden

Die Enzymuntersuchungen mit reinen Flavonoiden sollten einen Vergleich der inhibitorischen Eigenschaften von Pflanzenextrakten, den daraus hergestellten Fraktionen sowie Einzelkomponenten ermöglichen. Da eine Vielzahl verschiedener Flavonoide als definierte Substanzen erhältlich waren, wurde die Testung, die erst hinsichtlich der Birke mit Hyperosid und Quercetin durchgeführt wurde, auf verschiedene Vertreter der drei Flavonoidtypen ausgeweitet. Durch die Untersuchung von Verbindungen mit unterschiedlichem Substitutionsmuster ließen sich Aussagen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten. In den folgenden drei Tabellen sind die Ergebnisse des Screenings zusammengefasst.

Tabelle 15: Beeinflussung von Metallopeptidasen durch Flavone

		Hemmung in % bei c _{Max} =300µM						R ₅	R ₆	R ₇	R _{3'}	R _{4'}	
		NEP	ACE		LAP								
	Apigenin	31	<i>R</i> =6	18	<i>R</i> =2	42	<i>R</i> =21	OH		OH		OH	
	Acacetin	14	<i>R</i> =2	16	<i>R</i> =4	21	<i>R</i> =2	OH		OH		OCH ₃	
	Luteolin	66	<i>R</i> =7	55	<i>R</i> =28	10	<i>R</i> =2	OH		OH	OH	OH	
	Homoorientin	k.H.		15	<i>R</i> =3	k.H.		OH		OH	OH	OH	6-C-gluc
	Baicalein	36	<i>R</i> =11	10	<i>R</i> =3	57	<i>R</i> =6	OH	OH	OH			
	Chrysin	k.H.		k.H.		49	<i>R</i> =6	OH		OH			
	Sinensetin	k.H.		k.H.		k.H.		OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	
	Diosmin	k.H.		44	<i>R</i> =20	k.H.		OH		O-rut	OH	OCH ₃	
	Vitexin	k.H.		k.H.		k.H.		OH		OH		OH	8-C-gluc
	Diosmetin	k.H.		k.H.		45	<i>R</i> =2	OH		OH	OH	OCH ₃	
Flavon		k.H.		k.H.		k.H.							

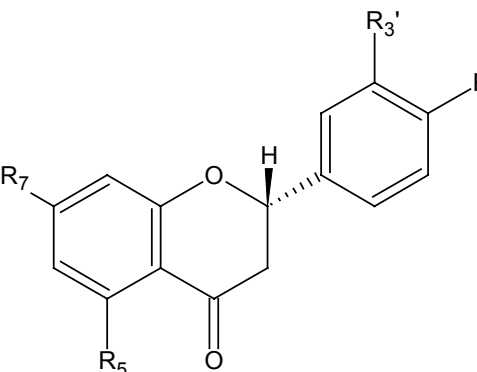
k.H.: keine Hemmung, Methoden s. Kapitel 4.8, $n \geq 4$

Tabelle 16: Beeinflussung von Metallopeptidasen durch Flavonole

		Hemmung in % bei $c_{\text{Max}} = 300 \mu\text{M}$						R_3	R_5	R_7	$R_{3'}$	$R_{4'}$	
		NEP		ACE		LAP							
	Quercetin	73	$R=13$	23	$R=5$	14	$R=4$	OH	OH	OH	OH	OH	
	Hyperosid	24	$R=2$	k.H.		k.H.		O-gal	OH	OH	OH	OH	
	Quercitrin	22	$R=5$	51	$R=17$	k.H.		O-rha	OH	OH	OH	OH	
	Rutin	25	$R=2$	k.H.		k.H.		O-rut	OH	OH	OH	OH	
	Fisetin	71	$R=15$	23	$R=5$	k.H.		OH		OH	OH	OH	
	Kämpferol	21	$R=4$	k.H.		12	$R=3$	OH	OH	OH		OH	
	Myricetin	68	$R=12$	26	$R=11$	48	$R=9$	OH	OH	OH	OH	OH	5'OH
	Rhamnetin	k.H.		23	$R=2$	54	$R=5$	OH	OH	OCH ₃	OH	OH	
	Isorhamnetin	k.H.		k.H.		49	$R=2$	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	
	Morin	33	$R=5$	14	$R=2$	18	$R=13$	OH	OH	OH		OH	2'OH

k.H.: keine Hemmung, Methoden s. Kapitel 4.8, $n \geq 4$

Tabelle 17: Beeinflussung von Metallopeptidasen durch Flavanone

		Hemmung in % bei c _{Max} =300µM				R ₅	R ₇	R _{3'}		R _{4'}	
		NEP		ACE		LAP					
	Naringenin	20	<i>R</i> =3	22	<i>R</i> =2	16	<i>R</i> =2	OH	OH	OH	
	Naringin	k.H.		37	<i>R</i> =23	k.H.		OH	(2-O-rha)-gluc	OH	
	Hesperetin	k.H.		18	<i>R</i> =1	10	<i>R</i> =3	OH	OH	OH	OCH ₃
	Hesperidin	k.H.		34	<i>R</i> =2	k.H.		OH	O-rut	OH	OCH ₃
	Eriocitrin	k.H.		28	<i>R</i> =7	k.H.		OH	O-rut	OH	OH

k.H.: keine Hemmung, Methoden s. Kapitel 4.8, n≥4

Die Untersuchungen ergaben, dass die Wechselwirkungen mit den Enzymen grundsätzlich über freie Hydroxylgruppen erfolgten. So übten der Grundkörper Flavon sowie die vollständig methoxylierte Verbindung Sinensetin auf keine der Peptidasen einen Effekt aus. Bei der NEP wurden von vier Substanzen Hemmungen über 50 % erreicht. Die Gemeinsamkeit dieser Aglyka der Flavone und Flavonole war die Hydroxylierung an Position 3' und 4'. Folgende IC_{50} wurden für diese Substanzen aus den Dosis-Effekt-Kurven (Abbildung 9) ermittelt:

Tabelle 18: IC_{50} der aktivsten Flavonoide gegenüber NEP

	IC_{50} in $\mu\text{mol/l}$
Luteolin	127
Quercetin	192
Fisetin	220
Myricetin	42

Werte ermittelt aus den Dosis-Effekt-Kurven (s. Abbildung 9)

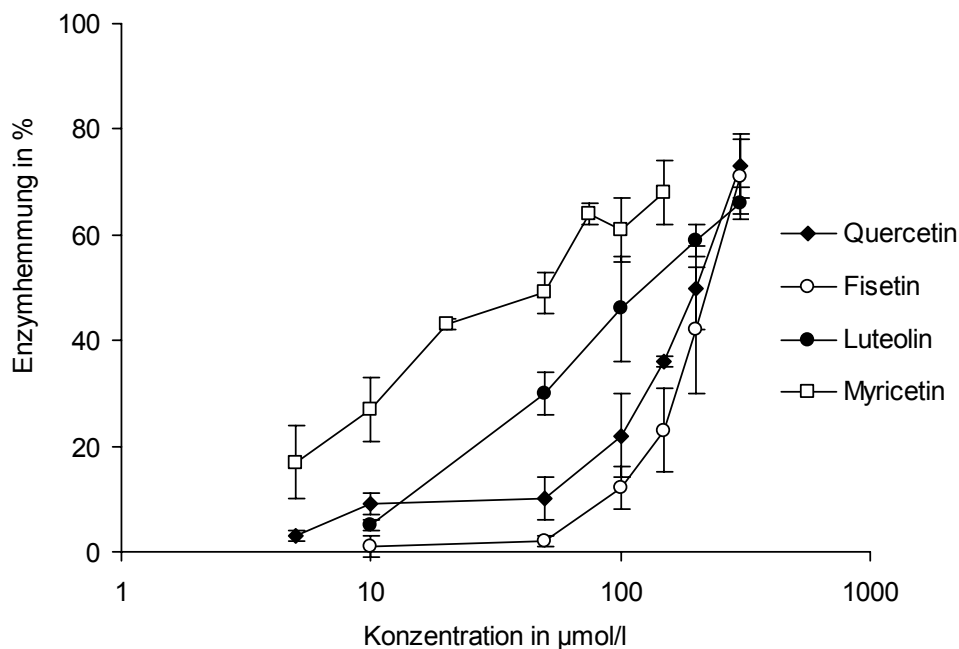


Abbildung 9: Dosis-Effekt-Kurven der NEP-Hemmung durch die aktivsten der untersuchten Flavonoide (Konzentration 5 - 300 $\mu\text{mol/l}$, Methode s. Kapitel 4.8.3, $n \geq 5$)

Aus den vorliegenden Daten ließen sich für NEP im Unterschied zu ACE und LAP gewisse Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten. So bewirkte eine Änderung der Stellung der benachbarten Hydroxylgruppen von 3', 4' (Quercetin, Myricetin) auf 2', 4' (Morin) eine Absenkung der Hemmwirkung. Ebenso lagen die Effekte von Substanzen mit nur einer OH-Gruppe am Phenylring (z.B. Apigenin, Kämpferol) im Bereich von 20-30 % bei der höchsten eingesetzten Konzentration. Die 3-O-Glykoside Hyperosid, Quercitrin und Rutin erwiesen sich nur als schwach aktiv, für ihr Aglykon Quercetin konnte dagegen bei gleicher Konzentration eine NEP-Hemmung von 73 % beobachtet werden. 7-O-Glykoside (Diosmin, Naringin) übten keinen Einfluss auf die Aktivität der NEP aus.

Bei den Untersuchungen zur ACE-Hemmung wurde keine Substanz herausgefunden, für die die Angabe einer IC_{50} möglich war. Gerade die stärkeren Inhibitoren der NEP übten geringere Wechselwirkungen auf dieses Enzym aus. Luteolin, Diosmin, Quercitrin, Naringin und Hesperidin zählten zu den aktivsten Verbindungen mit Hemmungen über 30 % bei der höchst möglichen Testkonzentration. Interessanterweise waren hier, mit Ausnahme von Luteolin, die Glykoside wirksamer als die Aglyka (Diosmetin, Quercetin, Naringenin).

Ebenso waren gegenüber LAP die meisten der NEP-inhibierenden Verbindungen inaktiv. Lipophilere Substanzen mit weniger Hydroxylgruppen (Apigenin, Chrysin, Baicalein) oder methoxylierte Vertreter wie Diosmetin, Rhamnetin und Isorhamnetin zeigten LAP-hemmende Effekte. Das in den Positionen 3', 4', 5, 5' und 7 hydroxylierte Myricetin war das einzige der getesteten Flavonoide, das neben der Wirkung auf NEP und ACE auch LAP hemmte.

2.2.1 Screening von Flavonoidmetaboliten

Da eine Wirkung von flavonoidhaltigen Arzneipflanzen auch Folge der Wirkungen von Metaboliten der Flavonoide sein könnte, wurden fünf Verbindungen auf ihre Enzymbeeinflussung getestet, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Pietta nach der oralen Applikation eines Ginkgoblätterextraktes im Urin von Ratten detektiert wurden (Pietta et al. 1995).

Tabelle 19: Beeinflussung von Metallopeptidasen durch Flavonoidmetabolite

	Max. Hemmung in %					
	NEP (500µM)	ACE (500µM)		LAP (1mM)		
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	k.H.	60	<i>R=8</i>	42	<i>R=4</i>	
4-Hydroxyphenylelessigsäure	k.H.	k.H.		k.H.		
3-Methoxy- 4-hydroxyphenylelessigsäure	k.H.	k.H.		k.H.		
3-Hydroxyphenylelessigsäure	k.H.	k.H.		k.H.		
4-Methylcatechol (= 3,4-Dihydroxytoluol)	k.H.	40	<i>R=3</i>	47	<i>R=2</i>	

k.H.: keine Hemmung, Methoden s. Kapitel 4.8, n≥4

Die Phenylelessigsäure-Derivate zeigten alle keinen Einfluss auf die NEP-Aktivität. ACE und LAP wurden von den Verbindungen mit zwei Hydroxylgruppen gehemmt, allerdings erst in hohen Konzentrationen, die aufgrund der besseren Löslichkeit im Vergleich zu den Flavonoiden getestet werden konnten.

2.2.2 Screening von Phenylpropanderivaten, Ononin sowie Verbindungen mit mehrfacher Hydroxysubstituierung

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der Enzymtestungen mit verschiedenen phenolischen Naturstoffen dargestellt. Auswahlkriterien für die Verbindungen waren die Vergesellschaftung mit Flavonoiden oder das Vorkommen *ortho*-ständiger OH-Gruppen am Aromaten als strukturelle Gemeinsamkeit zu den in den Testsystemen aktiven Flavonoiden.

Tabelle 20: Beeinflussung von Metallopeptidasen durch flavonoidverwandte Naturstoffe

	Hemmung in % bei c = 300µM					
	NEP		ACE		LAP	
Aesculetin	k.H.		k.H.		k.H.	
Alizarin	21	<i>R</i> =3	16	<i>R</i> =2	25	<i>R</i> =5
Chlorogensäure	k.H.		k.H.		k.H.	
Ellagsäure	36	<i>R</i> =5	34	<i>R</i> =2	k.H.	
Kaffeesäure	14	<i>R</i> =4	29	<i>R</i> =5	k.H.	
Oleuropein	15	<i>R</i> =4	38	<i>R</i> =9	k.H.	
Ononin	k.H.		k.H.		k.H.	
Resveratrol	24	<i>R</i> =4	k.H.		k.H.	
Rosmarinsäure	27	<i>R</i> =3	33	<i>R</i> =5	k.H.	

k.H.: keine Hemmung, Methoden s. Kapitel 4.8, n≥4

Für Kaffeesäure konnte bei 300 µM ein schwacher Einfluss auf ACE festgestellt werden. Ebenso verhielt sich die von der Kaffeesäure abgeleitete Rosmarinsäure, die zusätzlich auch auf NEP eine Hemmwirkung zeigte. Die durch Veresterung mit Chinasäure aus der Kaffeesäure entstehende Chlorogensäure zeigte keinen Einfluss auf die Enzyme.

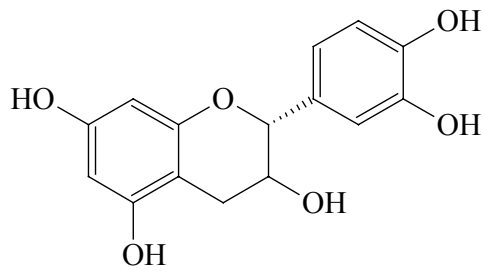
Das Isoflavon Ononin wurde ausgewählt, da die Anwendung der Wurzel von *Ononis spinosa* L. mit der gleichen Indikation wie die der Birkenblätter erfolgt. Ononin ist das 7-O-Glucosid des Formononetins, das am Phenylring (4') eine Methoxygruppe und an Position 7 eine OH-Funktion trägt. Das im Vergleich zu Quercetin lipophilere Aglykon besitzt nur eine Hydroxylgruppe zur Interaktion mit dem Protein. Für Ononin erklärt sich aus der Zuckerbindung an diese eine OH-Gruppe, die Inaktivität gegenüber den Enzymen.

Resveratrol (3,4',5-Trihydroxy-*trans*-stilben) wurde untersucht, weil es neben Proanthocyanidinen und Flavonoiden zu den Inhaltsstoffen des Rotweins zählt. Resveratrol zeigte allerdings nur auf die NEP einen schwachen Effekt mit einer Hemmung von 24 % bei 300 µM. So wird diese Komponente, im Gegensatz zu Flavonoiden und Proanthocyanidinen, über andere Mechanismen als über die Beeinflussung der untersuchten Metallopeptidasen zur positiven Herz-Kreislauf-Wirkung von Rotwein und Rotweinextrakten beitragen.

Gemeinsames Strukturmerkmal von Aesculetin, Alizarin, Ellagsäure und Oleuropein waren zwei *ortho*-ständige OH-Gruppen am Aromaten. Das Cumarinderivat Aesculetin wechselwirkte mit keiner der Peptidasen, das Anthrachinon Alizarin zeigte, wenn auch nur schwach, als einzige Verbindung eine Hemmwirkung auf LAP. Die Ellagsäure mit zweifacher o-Dihydroxystuktur zeigte bei 300 µM Effekte auf NEP und ACE über 30 %. Oleuropein, das bedeutsamste Phenolglucosid in grünen Oliven und Olivenblattextrakten, hemmte mit 38 % ACE am stärksten. Ein geringer Hemmeffekt trat bei dieser Verbindung auch gegenüber NEP auf.

2.2.3 Screening von Catechin und abgeleiteten Verbindungen

Die folgende Testserie wurde durchgeführt, um Vergleiche zwischen dem Flavonol Quercetin und den identisch hydroxylierten Verbindungen Catechin und Cyanidin zu ermöglichen. Weiterhin sollten die Effekte der isolierten Hauptkomponenten von Grünem Tee sowie die der Monomere der Proanthocyanidine untersucht werden.

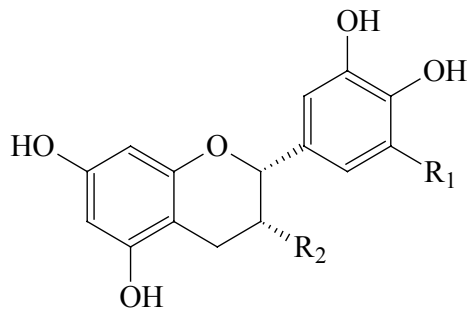


(+/-) - Catechin (C)

(-) - Epicatechin (EC)

$R_1 = H$

$R_2 = OH$



(-) - Epigallocatechin (EGC)

$R_1 = OH$

$R_2 = OH$

(-) - Epigallocatechingallat (EGCG)

$R_1 = OH$

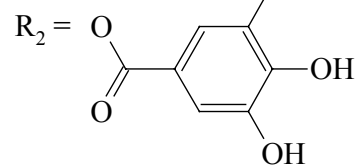


Abbildung 10: Chemische Strukturen der Catechin-Derivate

Tabelle 21: Beeinflussung von Metallopeptidasen durch Catechin u. abgeleitete Verbindungen

	Hemmung in % bei c = 300µM					
	NEP		ACE		LAP	
Quercetin	73	$R=13$	23	$R=5$	14	$R=4$
Cyanidinchlorid	89	$R=5$	25	$R=6$	60	$R=5$
(±)-Catechin	21	$R=6$	44	$R=9$	16	$R=3$
(-)-Epicatechin	21	$R=5$	n.b.		n.b.	
(-)-Epigallocatechin	33	$R=7$	n.b.		n.b.	
(-)-Epigallocatechingallat	86	$R=9$	n.b.		n.b.	

n.b.: nicht bestimmt, Methoden s. Kapitel 4.8, $n \geq 4$

Für Cyanidinchlorid konnte für die NEP-Hemmung eine IC_{50} von 32 μM bestimmt werden, somit war das geladene Anthocyanidin aktiver als das identisch substituierte Flavonoid Quercetin.

Catechin war gegenüber NEP deutlich weniger aktiv als Quercetin und Cyanidinchlorid. Die Testung von Epicatechin im Vergleich zu racemischem Catechin zeigte, dass die Enzymhemmung nicht von der Konfiguration des C_3 und damit von der Stellung der zugehörigen OH-Gruppe abhängig war. Eine zusätzliche OH-Gruppe am Phenylring (Epigallocatechin) bewirkte, wie bei den Flavonolen, eine Zunahme der Hemmaktivität. Aber erst durch die Veresterung mit Gallussäure (Epigallocatechingallat, EGCG) lag eine Verbindung vor, für die Hemmwerte über 50 % bei 300 μM erzielt wurden. Als NEP- IC_{50} für EGCG wurde eine Konzentration von 30 μM bzw. 14 $\mu g/ml$ bestimmt.

2.2.4 Screening von Triterpenen

2.2.4.1 Saponine und Sapogenine

Da Dammaranverbindungen der Birkenblätter nicht in ausreichender Menge verfügbar waren und deshalb nicht für Enzymtestungen verwandt werden konnten, wurden folgende Reinsubstanzen hinsichtlich ihrer NEP-Wirkung untersucht:

Tabelle 22: Beeinflussung der NEP durch Sapogenine und Saponine (300 μM)

	Hemmung in %
Oleanolsäure	43 $R=3$
Glycyrrhetinsäure	k.H.
Ginsenosid Rd	k.H.
Saponinum album (aus <i>Gypsophila</i> - sp.)	k.H.
β -Aescin	k.H.

k.H.: keine Hemmung, Methode s. Kapitel 4.8.3, $n \geq 4$

Nur das Aglykon Oleanolsäure zeigte einen Effekt gegenüber NEP. Bei 100 μM war aber auch bei dieser Substanz keine Hemmung mehr festzustellen. Glycyrrhetinsäure und die getesteten Saponine ergaben einen negativen Befund. Ginsenosid Rd wurde untersucht, da dessen Aglykon 20(S)-Protopanaxadiol (Dammar-24-en-3 β ,12 β ,20(S)-triol) sich vom Dammarangerüst

der in den Birkenblättern vorkommenden Verbindungen nur in der Konfiguration des C₃ unterscheidet (Betulafolientriol, Dammar-24en-3 α ,12 β ,20(S)-triol) (Atopkina et al. 1999).

2.2.4.2 Betulinsäure und Betulinol

Das Screening von Triterpenen wurde durch Untersuchungen des in der Birkenrinde vorkommenden Alkohols Betulinol, sowie der entsprechenden Säure Betulinsäure erweitert. Bei der zunächst durchgeführten Testung auf NEP-Inhibition bei 300 μ M und 150 μ M wurde im Assay durch die entsprechenden Kontrollen festgestellt, dass bei beiden Verbindungen der zweite Reaktionsschritt, d.h. die LAP-Aktivität, stark gehemmt wurde.

Tabelle 23: Effekte von Betulinsäure und Betulinol im NEP-Assay

		I_{Ges} (%)	I_{LAP} (%)	I_{NEP} (%)*
Betulinsäure	300 μ M	75	71	14
	150 μ M	66	43	40
Betulinol	300 μ M	90	60	75
	150 μ M	24	39	<0

* berechnet, Methode s. Kapitel 4.8.3, n \geq 2

Durch die starke Beeinflussung der LAP lieferte die verwendete NEP-Methode widersprüchliche Ergebnisse. Deshalb wurden die Substanzen am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin, mittels einer Methode mit [D-Ala²,Leu⁵]enkephalin (DALEK) als Substrat und ebenfalls Eberseminalplasma als Enzymquelle untersucht (Winkler et al. 1998). Hierbei wurde die Enzymaktivität über HPLC-Monitoring der Bildung des Abbauproduktes Tyr-D-Ala-Gly ermittelt und somit eine Interaktion der Testverbindungen mit nachfolgenden Reaktionsschritten ausgeschlossen. Bei diesem Testverfahren waren Betulinsäure und Betulinol ohne Einfluss auf die NEP-Enzymaktivität im untersuchten Konzentrationsbereich von 25 μ M bis 100 μ M.

Bei der LAP-Reaktion der eigenen NEP-Bestimmungsmethode herrschte als Reaktionsbedingung Enzymüberschuss bzw. Substratmangel, da während der Reaktionszeit das gebildete Phe-AMC vollständig abgebaut werden sollte. Somit konnte die Hemmaktivität von Betulinsäure und Betulinol auf LAP erst mit dem Assay auf Leu-pNA-Basis bei Substratsättigung beurteilt werden.

Bei 100 μM wurden Hemmwerte über 90 % beobachtet und sowohl für Betulinsäure als auch für Betulinol wurden IC_{50} -Werte unterhalb 10 μM bestimmt. Damit erwiesen sich diese beiden Verbindungen gegenüber dem Enzym sogar als stärker aktiv als der bekannte LAP-Inhibitor Bestatin.

Tabelle 24: IC_{50} der LAP-Hemmungen von Betulinsäure und Betulinol im Vgl. zu Bestatin

	IC_{50} in $\mu\text{mol/l}$
Betulinsäure	$7,3 \pm 1,4$
Betulinol	$8,8 \pm 1,7$
Bestatin	$16,9 \pm 4,1$

Werte ermittelt aus den Dosis-Effekt-Kurven (s. Abbildung 11)

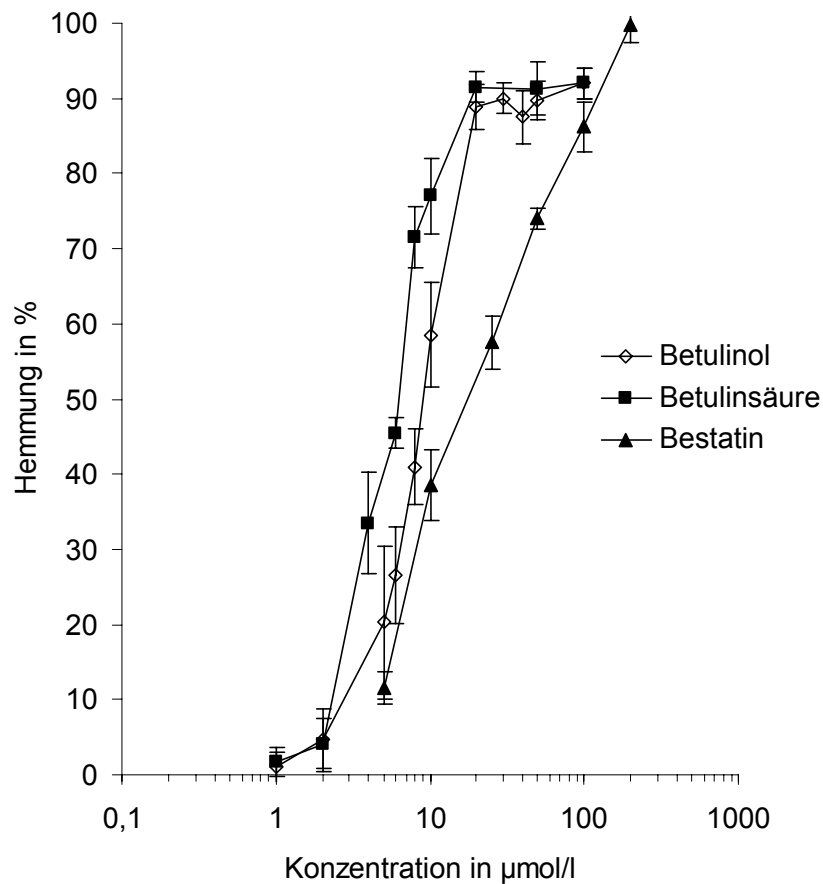


Abbildung 11: Hemmung der LAP durch Betulinsäure und Betulinol im Vergleich zu Bestatin (Konzentration 1 - 200µmol/l, Methode s. Kapitel 4.8.7, n≥5)

Die spezifische Wirkung der beiden Triterpene auf die LAP wurde unterstrichen durch die Effekte auf ACE, da bei diesem Enzym deutliche Hemmwirkungen erst bei der Maximalkonzentration von 300 µM auftraten.

Tabelle 25: Beeinflussung des ACE durch Betulinsäure und Betulinol

Konzentration in µM	Hemmung in %	
	Betulinsäure	Betulinol
300	72 <i>R</i> =4	26 <i>R</i> =5
150	16 <i>R</i> =5	10 <i>R</i> =2
50	3 <i>R</i> =4	11 <i>R</i> =2

Methode s. Kapitel 4.8.6, n≥4

2.3 Resorptionsuntersuchungen am isolierten Rattendünndarm

Die Untersuchungen wurden an einem *In-vitro*-Perfusionsmodell (Norta und Schöpke 1996) mit 10-15 cm langen Dünndarmsegmenten der Ratte durchgeführt. Bislang wurden mit dieser Apparatur Arzneistoffe auf ihr Resorptionsverhalten untersucht, nun wurde der HWExtr. der Birke, dessen Hauptflavonoid Hyperosid allein, sowie zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Publikationen zu anderen Modellen auch Rutin untersucht.

2.3.1 Vorversuche mit Flavonoiden

Zunächst wurde die Löslichkeit der Testkomponenten in der verwendeten Pufferlösung (pH 7,4) bei 37°C kontrolliert. Der HWExtr. sollte in einer Konzentration von 5 mg/ml eingesetzt werden. Entsprechend ergab sich aus dem Hyperosidgehalt von 3 % für dieses Flavonoid eine Konzentration von 0,15 mg/ml im Donatorkompartiment. Für Rutin und Quercetin wurden danach die gleichen molaren Konzentrationen (0,33 mmol/l) wie für Hyperosid festgelegt.

Im Unterschied zu dem Extrakt und den Glykosiden löste sich Quercetin nicht vollständig im Puffer (0,11 mg/ml). Bei dem Vorhaben, die Löslichkeit zu bestimmen, musste festgestellt werden, dass neben der schlechten Löslichkeit, das bedeutendere Hindernis die geringe Stabilität von Quercetin bei pH 7,4 war. Nach 30 min befanden sich nur noch 74 % und nach 180 min nur noch 39 % der Ausgangskonzentration in der überstehenden Lösung. In Anbetracht dieser Messergebnisse und der verschärften oxidativen Bedingungen während des Resorptionsversuches durch die Begasung mit Sauerstoff wurde reines Quercetin von den Untersuchungen bei pH 7,4 ausgeschlossen. Erst recht bei niederen pH-Werten wäre zur Untersuchung von Quercetin der Einsatz eines Lösungsvermittlers notwendig geworden, z.B. Cyclodextrin (Gräfe 2000), Tween (Shimoi et al. 1998) oder DMSO (Walgren und Walle 1999), und damit nicht mehr die Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen mit den Glykosiden gegeben. Weiterhin wäre eine empfindliche Kontrolle des Einflusses des Lösungsvermittlers, z.B. durch Überwachung des parazellulären Transports (Mannitol, L-Glucose) und/oder der elektrischen Leitfähigkeit des Darmsegmentes, unbedingt erforderlich gewesen.

Mit Hyperosid, Hyperosid im Extrakt und Rutin konnte nach den Ergebnissen der Stabilitätsprüfung unter den Bedingungen von pH 7,4 und 37 °C gearbeitet werden. Da aber ein Verlust von 17 % des Hyperosids nach 180 min auftrat, wurde ein sofortiges Ansäuern der abgenommenen Akzeptorproben in die Aufarbeitungsprozedur eingeschlossen.

2.3.2 Qualitativer Nachweis der Flavonoide in den Akzeptormedien

Die HPLC-Chromatogramme der Akzeptormedien bei Hyperosid- und Rutin-Applikation wiesen jeweils nur einen Peak auf, der jeweils bzgl. der Retentionszeit der Ausgangsverbindung entsprach. Durch die Analyse der Proben nach Zusatz von Isoquercitrin (Quercetin-3-glucosid) konnten durch Vergleich der relativen Retentionszeiten die Identitäten abgesichert werden. Nach Zusatz von Hyperosid bzw. Rutin trat jeweils kein weiterer Peak im Chromatogramm auf.

Beim Übertritt in das Akzeptormedium durch den gespülten Rattendarm *in-vitro* wurden beide Flavonoidglykoside nicht abgebaut. Bei Rutin fand weder eine Spaltung der endständigen Rhamnose zu Isoquercitrin statt, noch wurden die Glykoside zu nachweisbaren Mengen freien Quercetins umgesetzt. Auch eine Glucuronidierung eventuell entstandenen Quercetins zu Quercetin-3-glucuronid konnte ausgeschlossen werden, da dessen Maximum immer erst direkt hinter (0,5 min) dem des Glucosids detektiert wurde. Weitere Glucuronide des Quercetins, z.B. der Positionen 3', 4', 7 (Day et al. 2000a), standen nicht als Referenzsubstanzen zur Verfügung.

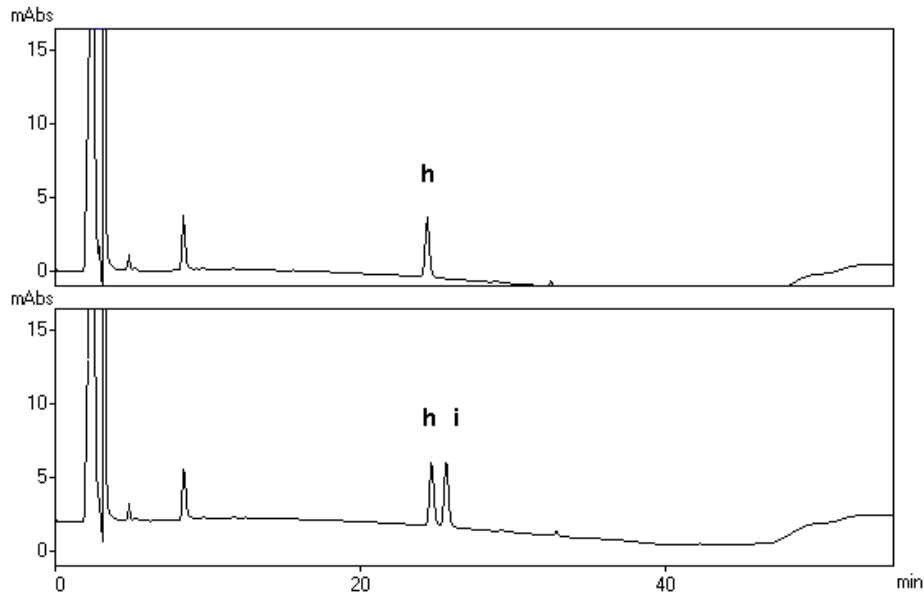


Abbildung 12: HPLC-Chromatogramme des Akzeptormediums nach 180 min Perfusion eines Rattendarmsegmentes mit **Hyperosid**, vor (oben) und nach (unten) Isoquercitrin-Zusatz

h: Hyperosid (t_R 24,3 min), **i:** Isoquercitrin (t_R 25,6 min). Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) 250-4, 30°C, Flussrate: 1 ml/min, Fließmittel A: 90%(V/V) 0,45N H_3PO_4 ; 10%(V/V) ACN, Fließmittel B: 10%(V/V) 0,45N H_3PO_4 ; 90%(V/V) ACN, Gradient: 0 min 5% B, 40 min 40% B, 45 min 5% B, Detektion: 254 nm

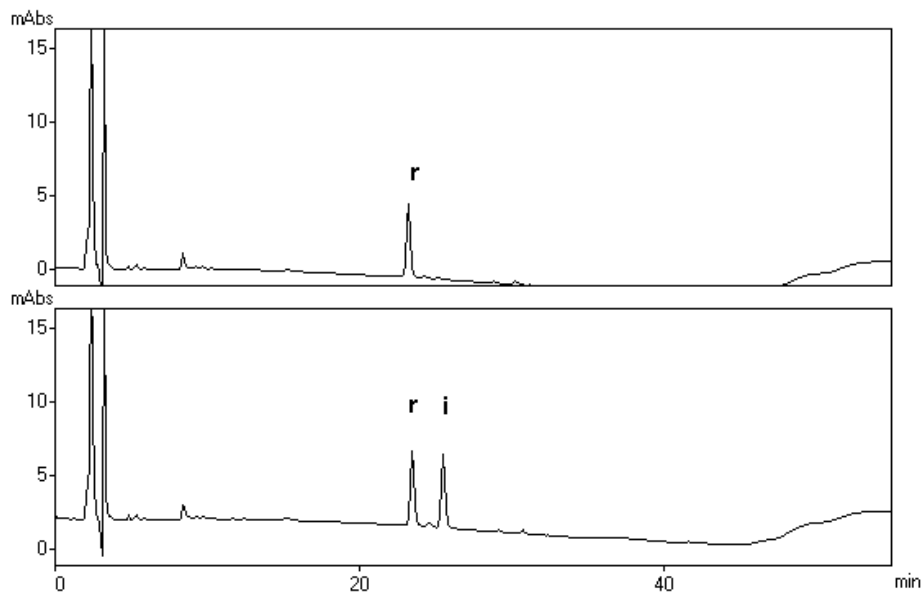


Abbildung 13: Chromatogramme des Akzeptormediums nach 180 min Perfusion eines Rattendarmsegmentes mit **Rutin**, vor (oben) und nach (unten) Isoquercitrin-Zusatz

r: Rutin (t_R 23,2 min), **i:** Isoquercitrin (t_R 25,5 min). Säule: LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) 250-4, 30°C, Flussrate: 1 ml/min, Fließmittel A: 90%(V/V) 0,45N H_3PO_4 ; 10%(V/V) ACN, Fließmittel B: 10%(V/V) 0,45N H_3PO_4 ; 90%(V/V) ACN, Gradient: 0 min 5% B, 40 min 40% B, 45 min 5% B, Detektion: 254 nm

2.3.3 Quantitative Bestimmung der absorbierten Flavonoide

Für die Perfusionen mit Hyperosid, Rutin und Birkenblätterextrakt wurden in Zeitabständen von 30 min durch HPLC die resorbierten Substanzmengen an Hyperosid bzw. Rutin ermittelt. Aus diesen konnten eine Resorptionsquote F_n [%] im Vergleich zu den im Donator vorgelegten Massen, sowie unter Berücksichtigung der etwas variierenden Längen der Darmsegmente Resorptionsraten R_n [nmol/cm] berechnet werden.

Der direkte Vergleich der Glykoside miteinander und die Beurteilung des Extrakteinflusses wurde durch Vergleich der Resorptionsraten R_n ermöglicht:

Tabelle 26: Resorptionsraten R_n für Hyperosid

Zeit in min	R_n in nmol/cm	Min.	Max.	R
30	0,81	0,00	1,68	1,68
60	2,82	1,41	3,98	2,57
90	4,97	2,42	7,51	5,09
120	6,85	3,77	10,22	6,45
150	9,09	5,11	13,50	8,39
180	11,18	6,60	17,39	10,79

In-vitro-Perfusionmodell (Rattendünndarm). 0,150mg/ml Hyperosid im Donator, n=5, Min.: minimaler Wert, Max.: maximaler Wert, R: Spannbreite in nmol/cm, Gehaltsbestimmung durch HPLC s. Kapitel 4.7, Berechnung R_n s. Kapitel 4.9.4

Tabelle 27: Resorptionsraten R_n für Hyperosid aus Birkenextrakt

Zeit in min	R_n in nmol/cm	Min.	Max.	R
30	2,05	1,59	2,52	0,93
60	3,73	3,03	4,42	1,39
90	7,31	7,09	7,53	0,43
120	7,51	6,94	8,08	1,14
150	9,46	8,43	10,49	2,06
180	11,34	11,21	11,47	0,26

In-vitro-Perfusionsmodell (Rattendünndarm). 5,0mg/ml HWExtr. im Donator, n=2, Min.: minimaler Wert, Max.: maximaler Wert, R: Spannbreite in nmol/cm, Gehaltsbestimmung durch HPLC s.Kapitel 4.7, Berechnung R_n s. Kapitel 4.9.4

Tabelle 28: Resorptionsraten R_n für Rutin

Zeit in min	R_n in nmol/cm	Min.	Max.	R
30	1,81	0,98	3,12	2,14
60	3,95	2,27	6,91	4,64
90	6,20	3,86	10,73	6,87
120	8,18	5,19	13,65	8,46
150	9,95	6,17	16,71	10,54
180	11,82	7,21	19,80	12,59

In-vitro-Perfusionsmodell (Rattendünndarm). 0,225mg/ml Rutin im Donator, n=3, Min.: minimaler Wert, Max.: maximaler Wert, R: Spannbreite in nmol/cm, Gehaltsbestimmung durch HPLC s.Kapitel 4.7, Berechnung R_n s.Kapitel 4.9.4

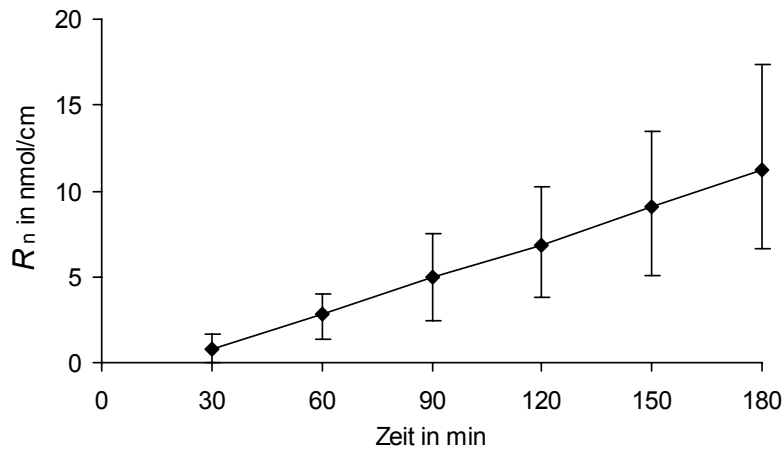


Abbildung 14: Resorptionsraten R_n für Hyperosid (0,150mg/ml im Donator, n=5)

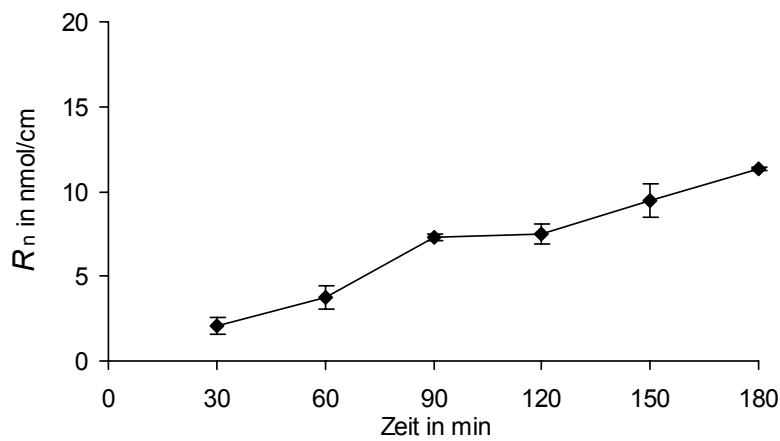


Abbildung 15: Resorptionsraten R_n für Hyperosid (5,0mg/ml HWExtr. im Donator, n=2)

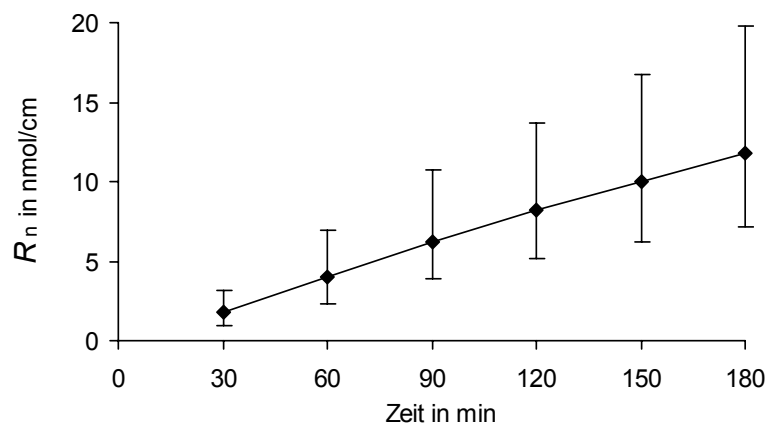


Abbildung 16: Resorptionsraten R_n für Rutin (0,225mg/ml im Donator; n=3)

Die Mittelwerte der resorbierten Stoffmengen Hyperosid und Rutin lagen über den gesamten beobachteten Zeitraum sehr dicht beieinander, obwohl die Messwerte der Versuchsreihen stark differierten. Die Resorption von Hyperosid erfolgte in dem gleichen Ausmaß wie die von Rutin und wurde durch die Applikation als Birkenblätterextrakt nicht beeinflusst. Der Kurvenverlauf in den graphischen Darstellungen blieb innerhalb der 180 min ansteigend, d.h. die Konzentration im Akzeptor näherte sich noch nicht einer Sättigungskonzentration.

Eine bessere Vorstellung des Ausmaßes der Resorption ermöglichte der Vergleich der Resorptionsquoten F_n [%], allerdings ohne Berücksichtigung der versuchstechnisch bedingten, etwas variierenden Längen der Darmabschnitte.

Tabelle 29: Resorptionsquoten F_{180} von Hyperosid, Hyperosid aus HWExtr. und Rutin

	F_{180} in %	Min.	Max.	R
Hyperosid 0,150 mg/ml im Donator, n=5	3,04	1,88	4,55	2,67
Hyperosid aus Birkenextrakt 5,0 mg/ml HWExtr. im Donator, n=2 (entspr. 0,15 mg/ml Hyperosid)	3,42	2,97	3,87	0,90
Rutin 0,225 mg/ml im Donator, n=3	2,45	1,26	3,68	2,42

In-vitro-Perfusionsmodell (Rattendünndarm). F_{180} : Resorptionsquote in % nach 180min
Min.: minimaler Wert, Max.: maximaler Wert, R: Spannbreite in nmol/cm, Gehaltsbestimmung durch HPLC s.Kapitel 4.7, Berechnung F_{180} s.Kapitel 4.9.4

Auch aus dieser Kenngröße ließen sich keine Unterschiede in den Resorptionseigenschaften der drei untersuchten Flavonoidlösungen ableiten. Nur ein geringer Anteil von etwa 3 % des in einer Konzentration von 0,33 mmol/l eingesetzten Quercetinglykosides Hyperosid bzw. Rutin wurde durch einen Dünndarmabschnitt der Ratte von 10-15 cm Länge in 180 min resorbiert.

2.4 Pilotstudie zum Wirksamkeitsnachweis von Birkenblättern

Für alkoholische und wässrige Birkenblätterrauszüge konnte durch Schilcher und Rau (1988) an Ratten eine signifikante aquaretische Wirkung nachgewiesen werden. Über die Wirksamkeit beim Menschen wurden bis heute keine kontrollierten Studien durchgeführt bzw. veröffentlicht. Nach den molekular-pharmakologischen Untersuchungen mit Birkenblätterextrakten und Einzelstoffen, sowie den Resorptionsstudien zu Flavonoiden sollte in diesem Teil der Arbeit deshalb das Resultat dieser Prozesse im Organismus beleuchtet werden, d.h. mit einer Pilotstudie die Effekte einer Einmalapplikation von Birkenblätterttee festgestellt werden. Die Dosierung und Darreichungsform wurde nach der ESCOP-Monographie ausgewählt. Aus 2,0 g getrockneten Birkenblättern wurde ein Infus bereitet und die Wirkung mit der gleichen Menge Leitungswasser verglichen. Wichtigstes Kriterium für die Beurteilung war das zeitabhängige Urinvolumen, weiterhin wurden im Urin der Elektrolytgehalt und die NEP-Aktivität bestimmt.

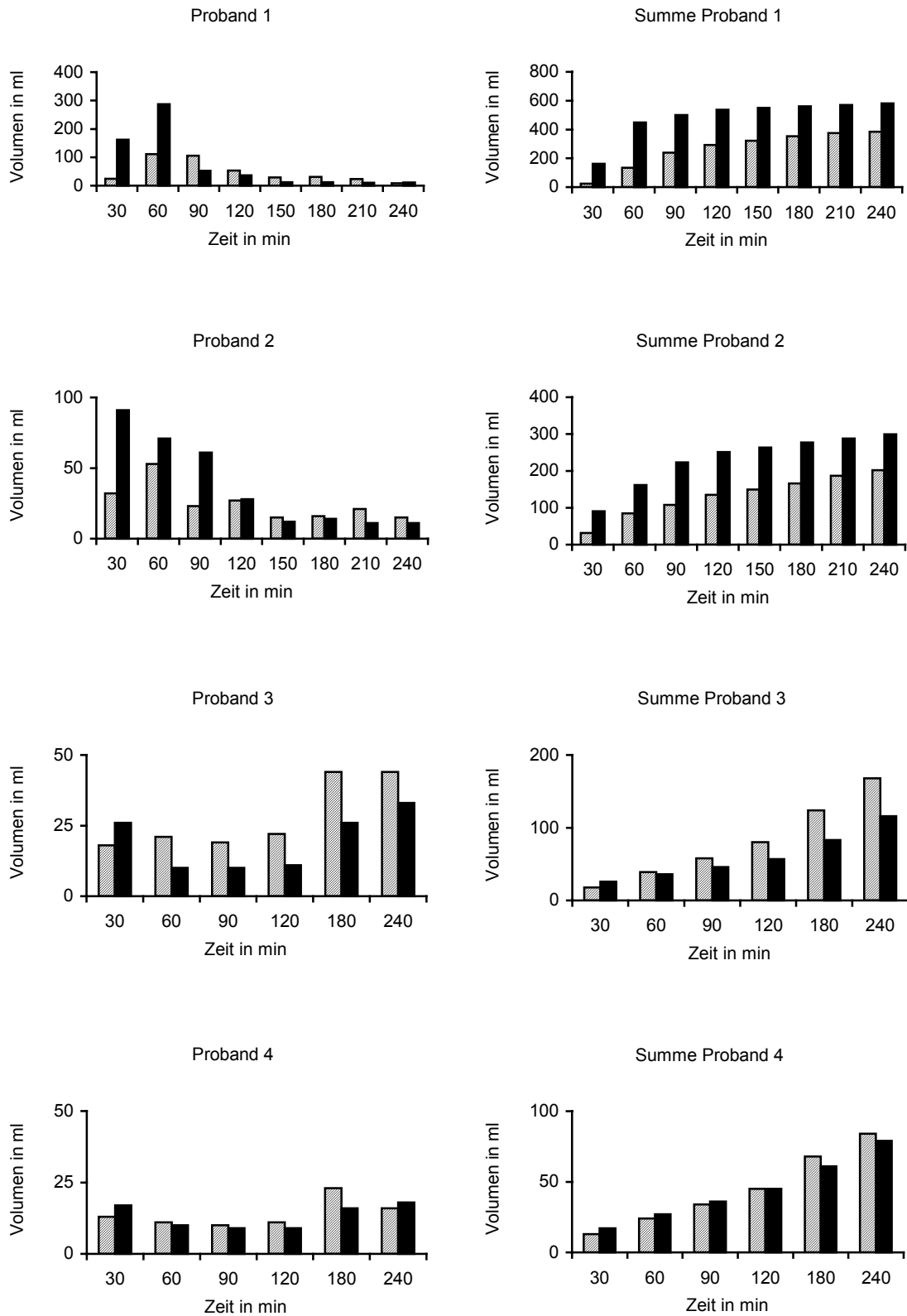




Abbildung 17: Urinvolumina der einzelnen Proben, sowie die summierten Volumina nach der Einnahme von Wasser  und Birkenblätterttee  für Probanden 1 bis 4

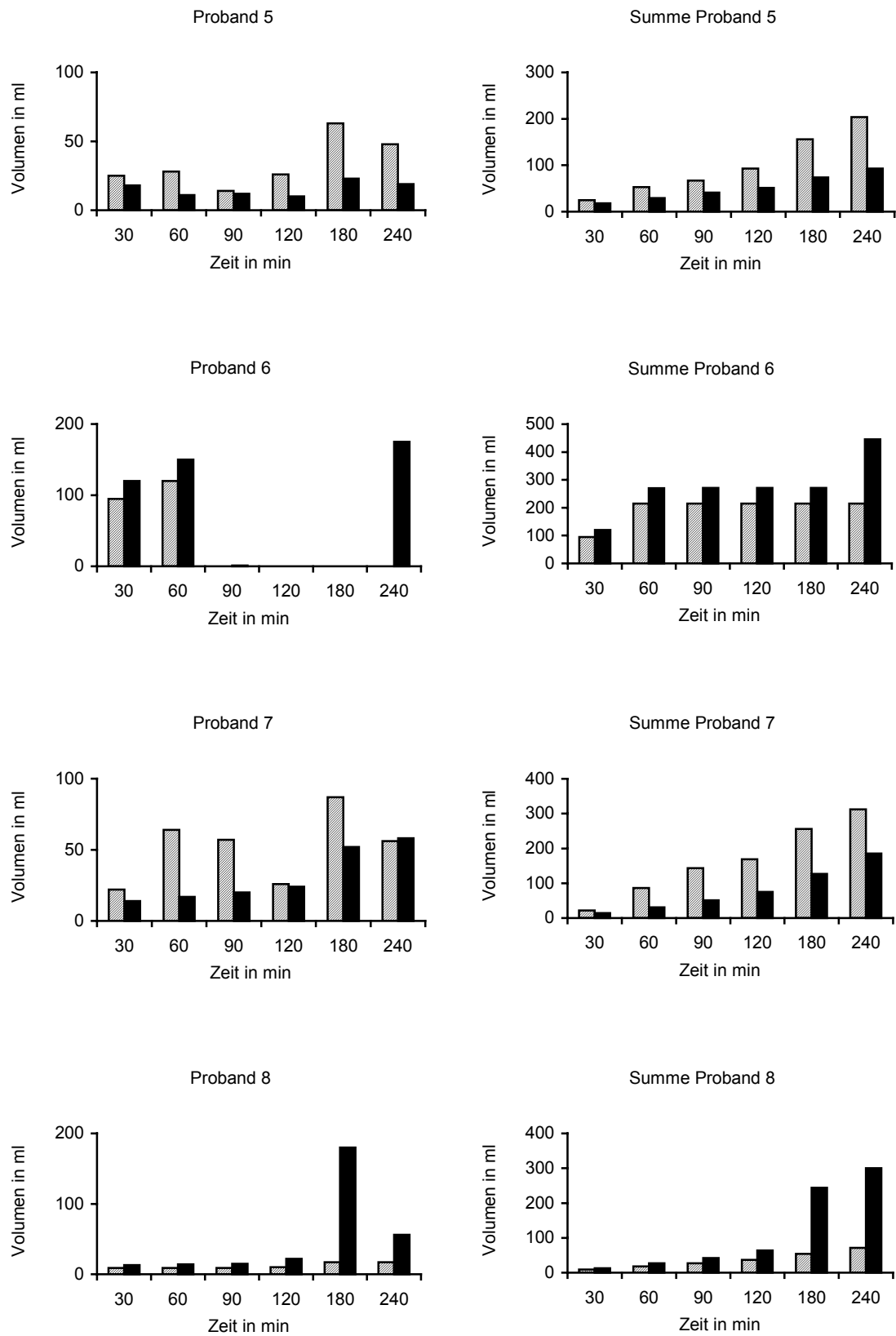




Abbildung 18: Urinvolumina der einzelnen Proben, sowie die summierten Volumina nach der Einnahme von Wasser  und Birkenblätterttee  für Probanden 5 bis 8

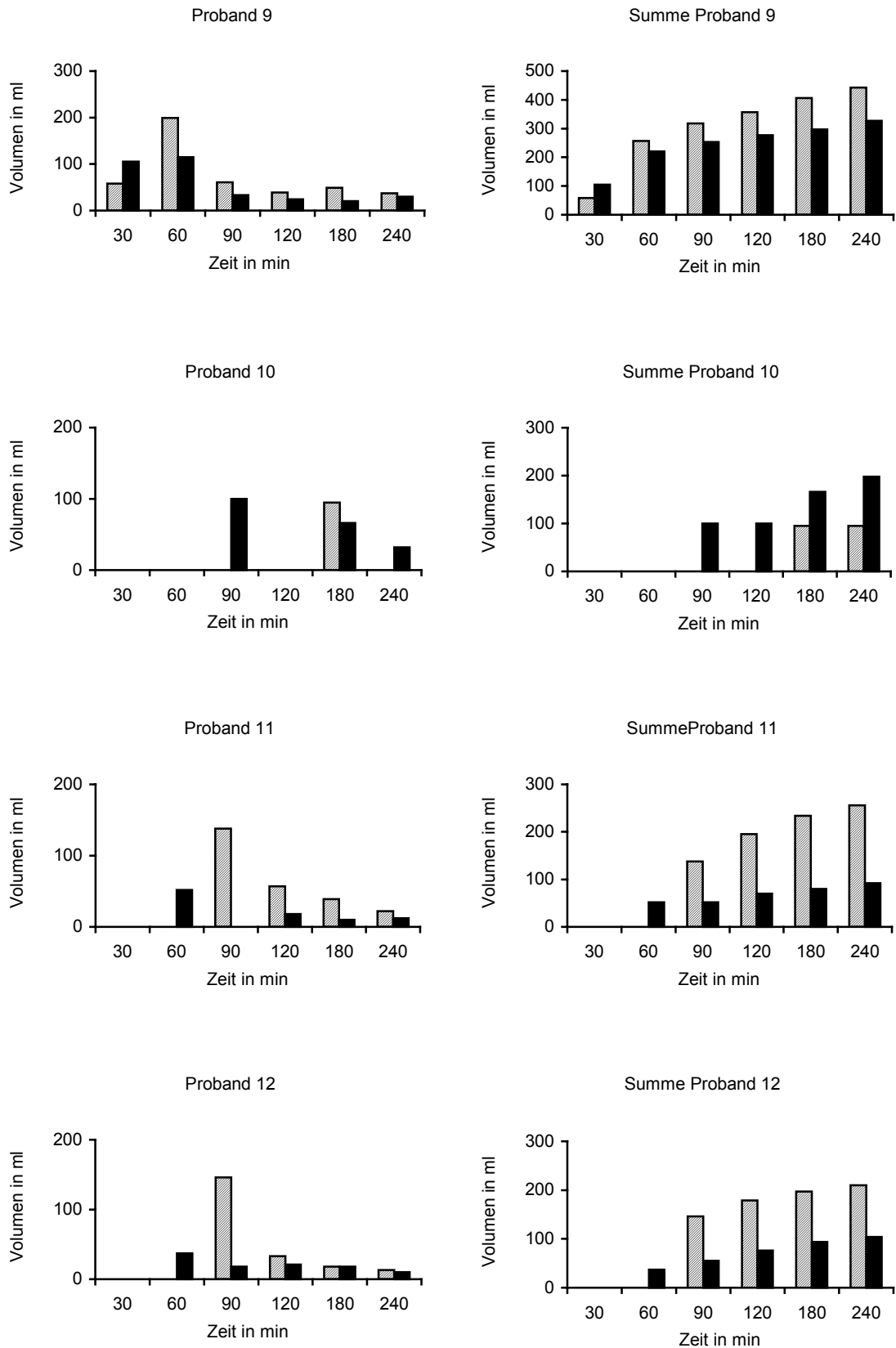




Abbildung 19: Urinvolumina der einzelnen Proben, sowie die summierten Volumina nach der Einnahme von Wasser  und Birkenblätterttee  für Probanden 9 bis 12

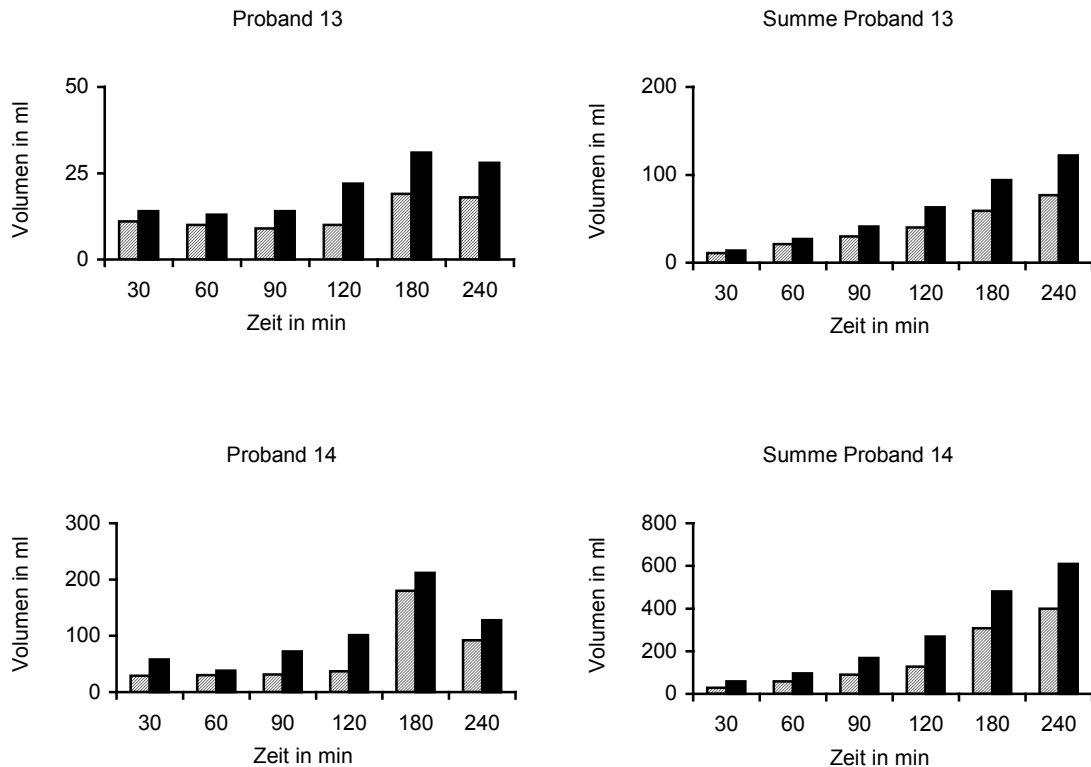




Abbildung 20: Urinvolumina der einzelnen Proben, sowie die summierten Volumina nach der Einnahme von Wasser  und Birkenblätterttee  für Probanden 13 und 14

Da die Reaktion auf Flüssigkeitszufuhr individuell sehr verschieden war, konnten, wie auch die anderen registrierten Parameter, die Urinvolumina nach Wasser und Teeapplikation nur innerhalb eines Probanden verglichen werden. Die Beurteilung erfolgte insbesondere aus den summierten Ausscheidungsdaten nach 60 min und 240 min. Bei sieben Personen war das Ausscheidungsvolumen nach Birkenblätterttee im Versuchszeitraum höher als bei der Wasserkontrolle (Probanden 1, 2, 6, 8, 10, 13, 14). Dabei war dieses bei sechs Fällen schon auf größere Beträge in den ersten 60 min der Testphase zurückzuführen. Bei sechs Testpersonen war insgesamt ein gegensätzlicher Effekt zu beobachten, das Urinvolumen war beim Wasser-Kontrollwert höher als bei der Teezufuhr (Probanden 3, 5, 7, 9, 11, 12), ebenso traten bei einem Probanden (4) keine Volumendifferenzen von mindestens 10 % auf.

In den folgenden Tabellen sind die Werte für die kontrollierten Parameter, die innerhalb der ersten 60 min bzw. über den gesamten Versuchszeitraum ausgeschieden wurden, zusammengefasst.

Tabelle 30: Vergleich der Summen der kontrollierten Parameter innerhalb der ersten 60 min nach Wasser- und Birkenblätterttee-Einnahme

Proband	Volumen in ml		Na ⁺ in mmol		K ⁺ in mmol		NEP in mU	
	Wasser	Tee	Wasser	Tee	Wasser	Tee	Wasser	Tee
1	135	449	5,0	12,2	5,8	4,7	144,4	95,7
2	85	162	6,3	9,3	4,3	6,3	126,7	111,7
3	39	36	8,3	6,3	3,5	4,4	71,8	80,7
4	24	27	1,8	3,8	2,0	2,3	88,9	121,4
5	53	29	7,7	1,7	5,7	1,8	140,0	103,3
6	215	270	8,1	4,2	9,2	3,5	196,7	216,0
7	86	31	10,2	6,7	6,9	4,6	144,1	110,6
8	18	27	2,2	2,8	4,6	2,4	75,2	111,9
9	257	220	16,5	26,1	7,4	14,1	187,9	182,9
10	0*	0*	0	0	0	0	0	0
11	0*	52	0	6,2	0	2,0	0	239,5
12	0*	37	0	6,7	0	1,7	0	105,2
13	21	27	3,2	6,4	1,3	1,8	169,5	133,5
14	59	96	12,5	10,7	4,0	3,2	105,8	123,1

* Proband konnte keinen Urin abgeben oder hat Probenzeitpunkt versäumt (Volumen gleich Null, keine Probe für Analytik vorhanden)

Tabelle 31: Vergleich der Summen der kontrollierten Parameter für die gesamte Testzeit von vier Stunden nach Wasser- und Birkenblätterttee-Einnahme

Proband	Volumen in ml		Na ⁺ in mmol		K ⁺ in mmol		NEP in mU	
	Wasser	Tee	Wasser	Tee	Wasser	Tee	Wasser	Tee
1	384	582	19,6	26,2	23,6	16,7	449,2	285,0
2	202	299	28,7	21,6	16,1	16,9	417,3	321,6
3	168	116	**	24,4	**	16,3	**	295,3
4	84	79	5,2	**	4,0	**	374,2	**
5	204	93	24,6	6,3	25,9	6,5	412,1	292,6
6	215	446	8,1	15,1	9,2	7,2	196,7	701,3
7	312	185	28,7	29,5	24,5	32,1	443,1	351,9
8	71	300	11,3	18,2	51,9	15,7	240,3	460,1
9	443	327	45,5	37,3	23,8	30,2	526,3	509,1
10	95	198	18,7	46,9	8,3	18,2	214,7	602,6
11	256	92	36,5	10,2	14,3	4,5	337,1	487,4
12	210	104	29,6	12,6	12,8	8,6	461,7	319,7
13	77	122	13,5	29	6,6	13,3	612,3	531,5
14	399	609	43,6	47,1	18,6	17,2	442,8	448,3

** Proband hat korrekt Volumen bestimmt, aber einmal keine Probe für weitere Analytik abgegeben, deshalb keine Summierung möglich

Für eine erleichterte Einschätzung der Effekte wurden für jeden Probanden die Daten der Tee-Applikation mit denen der Wasser-Kontrolle prozentual verglichen und benotet. Als Effekte wurden nur Änderungen über 10 % zur Kontrolle bewertet.

Tabelle 32: Beurteilung der Effekte nach Birkenblätterttee-Applikation im Vergleich zu Wasser

Proband	Volumen		Na ⁺		K ⁺		NEP-Aktivität	
	60 min	gesamt	60 min	gesamt	60 min	gesamt	60 min	gesamt
1	+	+	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	-	+	0	-	-
3	0	-	-	**	+	**	+	**
4	+	0	+	**	0	**	+	**
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	+	-	-	0	+
7	-	-	-	0	-	+	-	-
8	+	+	+	+	-	-	+	+
9	-	-	+	-	+	+	0	0
10	**	+	**	+	**	+	**	+
11	**	-	**	-	**	-	**	+
12	**	-	**	-	**	-	**	-
13	+	+	+	+	+	+	-	-
14	+	+	-	0	-	0	+	0

+ Steigerung auf über 110%; - Senkung unter 90%; 0 keine Änderung ($\pm 10\%$);

** wegen fehlender Daten kein Vergleich möglich

Die Betrachtung der Elektrolyte ergab, dass ein erhöhtes Urinvolumen auch eine erhöhte Natriumausscheidung bedeutete. Gleichfalls bestand der Zusammenhang zwischen verringerter Ausscheidung von Wasser und Natrium. Eine Abhängigkeit zwischen Harnvolumen und Stoffmenge Kalium war nicht so deutlich wie für Natrium erkennbar. Die Analyse des Kaliumgehaltes hätte im Falle des Nachweises einer starken Diurese Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus ermöglicht.

Bei allen Probanden konnte im Urin NEP-Aktivität nachgewiesen werden. Die Enzymaktivität des in 60 min abgegebenen Urins lag in der Größenordnung von 100 mU. Eine starke Hemmung des an den luminalen Mikrovilli des proximalen Tubulus lokalisierten Enzyms, das zusammen mit Membranabschilferungen auch mit dem Urin ausgeschieden wird, hätte sich in einer Beobachtung von gesunkener Enzymaktivität im Urin niederschlagen können. Solch einen Zusammenhang ließen die Messwerte nach Birkenblätterttee nicht erkennen. Die Auswertung der Pilotstudie zeigte, dass sich insbesondere bei sehr starker Zunahme des Urinvolumens (Probanden 6, 8, 10) die ausgeschiedene NEP-Aktivität vervielfachte.

3 DISKUSSION

3.1 Fraktionierung von Birkenblätterextrakten unter Beobachtung der NEP-Beeinflussung

Aus dem getrockneten Pflanzenmaterial wurden drei Extrakte hergestellt und bezüglich ihrer Hemmwirkungen auf die Enzyme NEP, ACE und LAP untersucht. Durch den Nachweis einer Hemmung der NEP und des ACE durch den Heißwasserextrakt der Birkenblätter konnte gezeigt werden, dass durch die Extraktion mit siedendem Wasser bei der Teezubereitung oder der Anwendung wässriger Extrakte in Handelspräparaten Inhaltsstoffe aus dem Pflanzenmaterial dem Menschen zugeführt werden, die als Enzyminhibitoren wirken und damit pharmakologisch aktive Verbindungen darstellen.

Zur Anreicherung potentieller Enzyminhibitoren wurde Pflanzenmaterial mit Petrolether entfettet und anschließend mit Ethylacetat und 80%igem Methanol extrahiert. Im EthacExtr. und MeOHExtr. befanden sich Komponenten, die Hemmwirkungen auf die Enzyme ausübten. Der MeOHExtr. wirkte am stärksten auf alle drei Peptidasen, bei gleichzeitig höchstem Hyperosidgehalt. Daher wurde zunächst dieser Extrakt weiter aufgetrennt, unter Beobachtung der NEP-Hemmaktivität. Jedoch schon die nächsten Fraktionierungsschritte zeigten, dass mit einer weiteren Aufreinigung der Birkenblätterflavonoidfraktion kein, dem DEV entsprechender Anstieg der Enzymhemmung zu verzeichnen war. Die eingeeengten polareren Begleitstoffe, wie auch die flavonoidhaltige Butanolfraktion hemmten gleichwertig die NEP mit einer IC_{50} bei ca. 50 µg/ml. Auch die Testung des Rohglykosidgemisches nach der Etherfällung ergab keine weitere Aktivitätszunahme. Die nachfolgende Auftrennung in eine stark gereinigte Hyperosidfraktion und weitere Fraktionen aus 2 bis 3 anderen Flavonolglykosiden an Sephadex LH-20 führte ebenso zu keiner Auffindung von Inhibitoren, die Hemmungen der NEP in tieferen Konzentrationsbereichen aufwiesen. Alle Flavonoidfraktionen zeigten NEP-Hemmungen. Dieses Ergebnis zeigte Übereinstimmung mit den Untersuchungen einzelner Quercetinglykoside, da die Art des Zuckers an Position 3 die Hemmaktivität gegenüber NEP nicht beeinflusste. Als Hauptursache für das „Im-Sande-Verlaufen“ der Hemmaktivität bei der bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung des MeOHExtr. konnte nur in Betracht gezogen werden, dass ein großer Anteil der

Wirkungen nicht durch Flavonoide, sondern durch andere polyphenolische Substanzen verursacht wurde, die phytochemisch schlecht charakterisierbar waren.

Im EthacExtr. konnten als Inhaltsstoffe Dammaranester und Flavonoide bestimmt werden. Der Hyperosidgehalt war wesentlich geringer, der Gehalt an freiem Quercetin höher als im HWExtr. und MeOHExtr. Durch zweifache SC an Kieselgel wurden Triterpene in Fraktionen angereichert. Die Kontrolle der NEP-Hemmung zeigte auch hier, dass die Suche nach der einen aktiven Verbindung bzw. Fraktion nicht zum Erfolg führte. Einerseits beeinflusste ein von der Polarität den Dammaranverbindungen ähnliches Chlorophyll ebenfalls die Enzymbestimmung, andererseits waren Fraktionen mit Quercetin aktiver als die Triterpenfraktionen. Der Vergleich des DEV und der Hemmwirkung der reinen Triterpenfraktionen ließ eine weitere Isolation wenig sinnvoll erscheinen. Erschwert war die Bewertung der Aktivität des EthacExtr., da weder für eine Gehaltsbestimmung noch für Enzymtestungen Referenzsubstanzen in den notwendigen Mengen verfügbar waren. Durch das Fehlen chromophorer Gruppen in den Molekülen der Dammaranverbindungen der Birke entfiel auch jegliche Charakterisierung der hergestellten Fraktionen mit HPLC-UV-Spektroskopie. Um diese Naturstoffgruppe trotzdem in die Betrachtung einzubeziehen, wurden die nicht im EthacExtr. enthaltenen Verbindungen Betulinsäure, Betulinol, Oleanolsäure, Glycyrrhetin sowie drei Saponine auf NEP-Hemmung getestet. Betulinsäure und Betulinol stellten sich als potente LAP-Inhibitoren heraus, deshalb erfolgt die Bewertung dieser Untersuchungen in einem eigenem Abschnitt. Für Oleanolsäure konnte bei der hohen Konzentration von 300 µmol/l ein Einfluss auf NEP beobachtet werden, alle anderen Triterpene waren gegenüber NEP inaktiv. Genau wie beim MeOHExtr. setzte sich die Gesamthemmung des EthacExtr. aus Einzelhemmungen verschiedener Fraktionen zusammen, wobei zusätzlich im Extrakt enthaltenes Chlorophyll die Hemmwerte in Richtung positiver Effekte verfälschte.

Zusammenfassend traf für beide Extrakte, die aus den Birkenblättern hergestellt und aufgearbeitet wurden, die Aussage zu, dass die Gesamtextrakte als „Wirkstoffe“ anzusehen waren, da sie stärker auf die Enzyme inhibierend wirkten als die Summe ihrer Einzelkomponenten.

3.2 Beeinflussung von Metallopeptidasen durch Flavonoide und verwandte Verbindungen

Das Screening mit verschiedenen substituierten Vertretern aus den Reihen der Flavone, Flavonole und Flavanone zeigte, dass das Enzym NEP am empfindlichsten auf Flavonoidzusatz reagierte. Nur die Flavonole Quercetin, Fisetin und Myricetin sowie das Flavon Luteolin wiesen Hemmungen auf, die pharmakologisch relevant erschienen. Die Effekte waren trotzdem keinesfalls mit denen der kompetitiven NEP-Inhibitoren Phosphoramidon oder Thiorphan vergleichbar, deren IC_{50} -Werte liegen im nanomolaren Bereich. Für die Flavonoide wurden IC_{50} von 42 $\mu\text{mol/l}$ bis 220 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt. Gemeinsamkeit dieser vier effektivsten Verbindungen war die Hydroxylierung an den benachbarten Positionen 3' und 4'. Myricetin, das am stärksten hydroxylierte Flavonol, besaß auch die geringste IC_{50} .

Interessanterweise zeigten die Quercetinglykoside, so auch Hyperosid, geringere Aktivität gegenüber NEP als ihr Aglykon. Daraus leiteten sich zwei wichtige Schlussfolgerungen ab. Erstens kann eine bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung von pflanzlichem Material, das genuin glykosidische Komponenten enthält, zu falsch negativen Ergebnissen führen. Zweitens sollten *In-vitro*-Testungen nur im Zusammenhang mit Daten zur Bioverfügbarkeit bzw. Biotransformation der entsprechenden glykosidischen Naturstoffe diskutiert werden.

Ein systematisches Screening für Flavonoide und ähnliche Verbindungen bzgl. der Effekte auf NEP und ACE wurde bis jetzt noch nicht publiziert. Einige Autoren untersuchten bisher die ACE-Hemmung weniger Flavonoide, z.B. Astragalin und Isoquercitrin (Kameda et al. 1987) oder Morin und Amentoflavon (Wagner et al. 1991), die aus traditionellen Arzneidrogen isoliert wurden. Kameda et al. (1987) zeigten, dass die Effekte der Flavonolglucoside und deren Gallate auf die ACE-Aktivität vom Flavonolgrundgerüst abhängig waren. Allerdings wurden hier 2''-O-Galloylglucoside untersucht, d.h. im Unterschied zum Epigallocatechingallat des Grünen Tees war eine OH-Gruppe der Glucose und nicht eine des Flavonoid/Catechin-Grundgerüsts mit Gallussäure verestert. In den Testungen wurde eine maximale Hemmung von 67 % für Astragalin bei 300 $\mu\text{g/ml}$ (entspr. 670 $\mu\text{mol/l}$) angegeben. Somit wurde bei

dieser Gruppe mit noch höheren Konzentrationen als in den eigenen Untersuchungen gearbeitet. Wagner et al. (1991) beobachteten eine ACE-Hemmung von Flavonoiden und Proanthocyanidinen bei Konzentrationen von 0,33 mg/ml mit einer in der Literatur nicht gebräuchlichen Methode. Wiederum aus einem Konzentrationsvergleich wurde erklärbar, dass das bei den eigenen Testungen wenig aktive Morin (300 µmol/l; 14 %) hier Hemmungen von 64 % (1 mmol/l) hervorrief.

Von Parellada et al. (1998) wurden bereits systematische Untersuchungen mit Flavonoiden und Zink-Metallopeptidasen durchgeführt, Gegenstand waren die Cytosolische Aminopeptidase (EC 3.4.11.1), Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1) und bereits die LAP (EC 3.4.11.2). Bei der verwendeten Flavonoidkonzentration von 100 µmol/l wurden für die LAP nur schwache Hemmwirkungen bis maximal 35 % gefunden. Die in den eigenen Testungen für z.B. Apigenin, Baicalein oder Rhamnetin beobachteten Hemmungen über 40 % wurden bei der dreifach höheren Konzentration von 300 µmol/l bestimmt. Strukturelle Voraussetzung für die Interaktion mit den Metallopeptidasen war bei den Autoren die Doppelbindung zwischen den Positionen 2 und 3. Die an dieser Bindung gesättigten Flavanone zeigten in den eigenen Experimenten ebenfalls keine Wirkung auf NEP und LAP, dagegen schien diese Hypothese nicht auf die eigenen Versuche mit ACE übertragbar zu sein. Ebenso wie bei den eigenen Versuchen, konnte für diese drei Enzyme kein gemeinsames Hydroxylierungsmuster als Bedingung für eine Aktivitätsbeeinflussung herausgefunden werden. Wichtig zur Aufklärung des Angriffspunktes der Flavonoide auf die Enzyme waren die beschriebenen Experimente mit und ohne Zn^{2+} -Zusatz in den Reaktionsansätzen. Die Hemmung der Aktivität der Metallopeptidasen hatte demnach ihre Ursache nicht in Wechselwirkungen der phenolischen Hydroxylfunktionen mit dem Zinkion des aktiven Zentrums. Da Flavonoide Chelate mit Kationen wie Eisen oder Aluminium bilden, lag diese Vermutung zum Mechanismus nahe. Aber zu den vielen bekannten Enzymen, die durch Flavonoide gehemmt werden, zählen viele nicht zur Gruppe zinkhaltiger Enzyme, beispielhaft seien Trypsin (Parellada und Guinea 1995) oder c-AMP-Phosphodiesterase (Nikaido et al. 1982) aufgeführt.

Angeichts der schwachen pharmakologischen Effekte der Flavonoide, wenn man die Konzentrationsbereiche der *In-vitro*-Testungen beachtet, trifft deren Charakterisierung als „wirksamkeitsmitbestimmende Verbindungen“ genau zu. Vermutlich setzen sich pharmakologische Wirkungen von Arzneipflanzen aus der Summe der Effekte von Flavonoiden und weiteren Komponenten und gleichzeitig aus der Summe von geringen Effekten der Naturstoffe auf mehrere Enzym- oder Rezeptorsysteme zusammen. So könnten zur Wirkung der deglykosylierten Flavonoide die der Metabolite 4-Methylcatechol und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und die der in Extrakten mit Flavonoiden vorkommenden Kaffeesäurederivate hinzukommen. Der Beitrag von Catechinen und Gerbstoffen soll in dem nächsten Abschnitt diskutiert werden.

3.3 Gerbstoffe in Pflanzenextrakten und Interaktionen bei pharmakologischen Testungen

Birkenblätter enthalten neben Flavonoiden Proanthocyanidine (Gorecki und Seiz 1992), wobei neuere Untersuchungen zu Gehalt und Strukturen fehlen. Weiterhin wurden erst vor kurzer Zeit Strukturen hydrolysierbarer Gerbstoffe in Birkenblättern aufgeklärt (Salminen et al. 1999). In den eigenen Untersuchungen wurde der Gerbstoffgehalt der Blattdroge bestimmt. Mit 4,5 % lag dieser Gehalt unter dem anderer Gerbstoff-Blatt-Drogen, wie Walnuss- oder Brombeerblätter. Das Monomere der Proanthocyanidine, Catechin, wurde in der verwendeten Droge nachgewiesen, das Vorkommen des Catechins in Birkenblättern wurden bereits beschrieben (Ossipov et al. 1996). Gerade die Extraktion mit Heißwasser oder Wasser-Aceton- bzw. Wasser-Methanol-Mischungen führte zur Überführung dieser Substanzen in die Drogenextrakte. Dass Gerbstoffe, die Eiweiße denaturieren, ebenso konzentrationsabhängig mit Enzymen wechselwirken, ist eine logische Konsequenz. Für den HWExtr. und den MeOHExtr. wurde gezeigt, dass nach einer Behandlung mit Hautpulver die Hemmaktivität gegenüber NEP sehr stark abnahm. Die Problematik bestand nun darin, diese „Gerbstoffeffekte“ der Pflanzenextrakte zu bewerten. Bei jeder bioaktivitätsgeleiteten Fraktionierung pflanzlichen Materials müssen mögliche Wechselwirkungen von Gerbstoffen mit dem Testsystem berücksichtigt werden, sonst kann es zu einem Übergehen von Fraktionen mit spezifisch wirkenden

Verbindungen, die aber niedrig konzentriert vorliegen, führen. Allerdings werden aktuell den kondensierten Gerbstoffen positive pharmakologische Effekte zugeordnet (Übersicht in Kaul 1996). Gerade für die positiv inotrope Wirkung von Weißdorn und die protektiven Effekte des Rotweins bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen werden die oligomeren Proanthocyanidine (OPC) als Wirkstoffe diskutiert. Wenn für diese Pflanzen die OPC als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe akzeptiert werden, so sollte zumindest auch partiell die Wirkung anderer Drogen, wie z.B. die der Birkenblätter, auf den Gehalt an OPCs zurückgeführt werden. So wie für die Flavonoide, muss erst recht für die Proanthocyanidine die Problematik der Resorption betrachtet werden, die hohe Anforderungen an die Analytik stellt. Erste Untersuchungen zur Resorption von Dimeren wurden bereits publiziert (Spencer et al. 2001), hierbei trat während des Transfers eine Spaltung in Epicatechin auf. Solche Monomere vom Catechintyp konnten im Plasma nach der Applikation von Wein oder Grünem Tee detektiert werden (Maiani et al. 1997, Donovan et al. 1999, Zhu et al. 2000). In Zukunft sollten Flavonoide und Gerbstoffe nicht, wie anfänglich bei den Birkenblättern in den eigenen Untersuchungen, von einander getrennt bei der Findung wirksamkeitsmitbestimmender Komponenten von Arzneipflanzen betrachtet werden, sondern im Komplex gesehen werden.

3.4 Bewertung der Ergebnisse mit Birkenblätterextrakten im Vergleich zu anderen Pflanzenextrakten

3.4.1 Solidago-, Crataegus- und Grüntee-Extrakte

Den Herba-Drogen aus *Solidago*-Arten wird, genau wie den Birkenblättern, eine aquaretische Wirkung zuerkannt, zusätzlich existieren noch spasmolytische und antiphlogistische Wirkkomponenten. Ein Vergleich der Inhaltsstoffe ergibt, dass *Betula* und *Solidago* als Gemeinsamkeit Flavonoide vom Flavonoltyp aufweisen. Nur *Solidago* dagegen enthält Triterpensaponine (Hiller und Bader 1996), die im Unterschied zu den lipophilen Triterpenen der Birkenblätter, mit Methanol-Wasser-Mischungen extrahiert werden können. Die Untersuchungen bezüglich der Hemmaktivität gegenüber NEP zeigten, dass die methanolischen *Solidago-virgaurea*-Extrakte Stoffe mit hemmenden Eigenschaften enthielten. Der Vergleich von aufgereinigten Saponin- und Flavonoidfraktionen zeigte, dass

die Effekte nicht durch die Saponine hervorgerufen wurden. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit der Inaktivität der im Screening untersuchten Einzelsaponine vom Triterpentyp. Aus den Ergebnissen ließ sich ableiten, dass auch bei dieser Droge die aquaretische Wirksamkeit auf die Hemmung von NEP zurückzuführen sein könnte. Daraus folgt, dass die durch Birkenblätter festgestellte Hemmung von Metallopeptidasen nicht spezifisch für diese Droge ist, sondern dass andere flavonoid- und polyphenolhaltige Arzneipflanzen ebenfalls in den verwendeten Bestimmungsmethoden Aktivität aufweisen können und die Enzymhemmung für deren Wirksamkeitserklärung in Betracht zu ziehen ist.

Die untersuchten *Crataegus*-Extrakte der Fa. Schwabe, waren als proanthocyanidinreiche Fraktionen deklariert. Durch diesen hohen Gehalt an Verbindungen, die als kondensierte Gerbstoffe mit Proteinen wechselwirken, waren die hohen Wirkpotenzen gegenüber den drei Enzymen erklärbar. Durch die Untersuchungen dieser *Crataegus*-Extrakte stand Vergleichsmaterial für die eigene, aus den Birkenblättern isolierte Proanthocyanidinfraktion (J) für DC, Enzymtestungen und Bindungsuntersuchungen mit Hautpulver zur Verfügung. Eine sehr gute Übereinstimmung der Hemmergebnisse auf alle drei Metallopeptidasen konnte festgestellt werden, z.B. lag die IC_{50} der NEP jeweils bei 10 µg/ml. Wie für MeOH Extr. und HW Extr. der Birkenblätter wurde für die *Crataegus*-Extrakte die Veränderung der NEP-Beeinflussung, nachdem Lösungen mit Hautpulver behandelt wurden, untersucht. Auch hier zeigte sich, dass die Proanthocyanidine an das Hautpulver gebunden wurden und somit nicht mehr frei in der Lösung vorlagen, um mit der NEP bei der sich anschließenden Enzymbestimmungsmethode zu interagieren. Wie bei der Goldrute bezüglich der Flavonoide, kann nun genauso hinsichtlich der Proanthocyanidine bestätigt werden, dass die durch Birkenextrakt ausgelösten Enzymhemmungen auch mit anderem proanthocyanidinhaltigen Pflanzenmaterial zu bewirken sind.

Weißdornblätter und –blüten werden bei nachlassender Leistungsfähigkeit des Herzens entsprechend Stadium II nach NYHA eingesetzt, als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe werden besonders die enthaltenen oligomeren Proanthocyanidine (OPC) betrachtet. Neben Radikalfängereigenschaften, der Wirkung auf den Herzrhythmus und die Herzfrequenz

wurde für die OPC auch eine blutdrucksenkende Wirkung beschrieben. Als Mechanismus wurde hierfür eine ACE-Hemmung diskutiert (Kaul 1996, Dingermann 2000, Chatterjee et al. 1997, Zapfe 2001). Auch in den eigenen Untersuchungen hemmten die proanthocyanidinreichen Fraktionen aus *Crataegus* ACE. Gleichzeitig war ein Effekt gegenüber NEP in geringeren Konzentrationen festzustellen. So könnte neben der bekannten ACE-Hemmung eine Wirkungsverlängerung des ANP und die resultierende Vorlastsenkung zu den positiven Wirkungen des Weißdorns auf das Herz-Kreislauf-System beitragen, in Analogie zu den Effekten synthetischer dualer ACE-NEP-Inhibitoren.

Die Besonderheit von Grünem Tee, ist sein Gehalt an niedermolekularen Catechinen und deren Gallussäureester. Der epidemiologisch nachgewiesene Zusammenhang zwischen der regelmäßigen Aufnahme von Grünem Tee und dem verringertem Auftreten von Krebs und koronarer Herzkrankheit konnte experimentell vor allem durch die pharmakologischen Eigenschaften der Komponente Epigallocatechingallat (EGCG) unterstützt werden (Metz 2000a, Dufresne und Farnworth 2001, Riemersma et al. 2001). Auch in den eigenen Untersuchungen zeigte die mit Gallussäure veresterte Verbindung stärkere Hemmaktivität gegenüber NEP als Catechin und Epicatechin. Ein Vergleich der IC₅₀-Werte von Epigallocatechingallat (14 µg/ml) und des auf 15 % Gehalt an dieser Substanz eingestellten Extraktes (40 µg/ml) zeigte, dass die Gesamtwirkung nicht allein auf diese Komponente zurückgeführt werden konnte. Die Einstellung der Extrakte auf einen konstanten Gehalt an dieser pharmakologisch aktivsten Verbindung ist jedoch als sinnvoll anzusehen.

3.4.2 Rotweinxtrakt, Quercetin und Resveratrol - Beeinflussung von NEP und ACE an SK-N-SH-Zellen

Wie in Ostasien dem Grünem Tee, konnte für den mediterranen Kulturkreis dem Rotwein ein protektiver Effekt bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen und der Häufigkeit von Krebsentstehung nachgewiesen werden („French Paradox“). Der günstige Einfluss des Rotweins wird neben dem moderatem Ethanolkonsum mit der regelmäßigen Zufuhr der enthaltenen Polyphenolfraction begründet. Zu den bedeutendsten Inhaltsstoffen zählen hierfür, die wie in *Crataegus* in hoher Konzentration vorliegenden

Proanthocyanidine, Quercetin und Resveratrol, eine für den Rotwein charakteristische Stilbenverbindung (Constant 1997, Soleas et al. 1997a, Soleas et al. 1997b, Metz 2000b).

Die beiden Rotwein-Extraktivstoffe Quercetin und Resveratrol wurden zusammen mit einem Rotweinextrakt im Rahmen einer Diplomarbeit (Escher 2000) auf die Hemmwirkung auf NEP und ACE untersucht. Die Bestimmungsmethoden der vorliegenden Arbeit wurden angewandt, jedoch auf SK-N-SH-Zellen (humane Tumorzellen aus Neuroblastomgewebe) übertragen, auf deren Oberflächen die beiden Peptidasen lokalisiert waren. Die Testung der Extraktivstoffe ermöglichte einen Vergleich der Ergebnisse mit den eigenen Versuchen an den gelösten Enzymen. Für die NEP stimmte die für Quercetin ermittelte IC_{50} überein. Resveratrol war im Vergleich zu Quercetin jeweils wesentlich schwächer bzw. gar nicht gegenüber NEP aktiv. Im Falle von ACE existierten Unterschiede zum isolierten Enzym. Das Enzym des Zellsystems reagierte empfindlicher auf die beiden Stoffe, und es konnten demzufolge für Resveratrol und Quercetin IC_{50} -Werte von 486 $\mu\text{mol/l}$ und 226 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt werden. Das Rotweinyophilisat hemmte beide Peptidasen, wobei die NEP-Aktivität wiederum durch geringere Konzentrationen im Vergleich zu ACE beeinflusst wurde.

Durch die Arbeit an Zellen war es möglich, Langzeiteffekte der Naturstoffe zu untersuchen. Hierbei wurden unter Beachtung der Toxizitäten Konzentrationen von 1-10 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt, die weit unterhalb der in den direkten Testungen wirksamen Konzentrationen lagen. Ermittelt und verglichen wurden die Veränderung der Enzymaktivitäten an den Zelloberflächen, sowie die Proliferationsentwicklung nach 96stündiger Inkubation unter Zusatz von Quercetin, Resveratrol und Rotweinextrakt.

Die Kultivierung der Zellen mit den Substanzen bewirkte, dass die Zellen vermehrt NEP und ACE ausbildeten. Bei Konzentrationen, die eine Aktivitätssteigerung der Enzyme hervorriefen, war parallel eine Proliferationshemmung zu verzeichnen. Aufgrund der gleichzeitigen Aktivitätssteigerung der verbliebenen Zellen konnte abgeleitet werden, dass die Proliferationshemmung nicht auf einer toxischen Wirkung der Stoffe beruhte.

Die Hypothese, dass Quercetin, Resveratrol und der Gesamtextrakt aus Rotwein über die Hemmung der Ektoenzyme eine Down-Regulierung von NEP und ACE an den Zellen bewirken, konnte nach diesen Ergebnissen nicht aufrecht erhalten werden. Die Down-Regulierung der Peptidasen würde einer Blutdrucksenkung entsprechen. Anhand der Ergebnisse wäre durch die erhöhte Aktivität der Enzyme eine Verminderung von ANP und Bradykinin und eine Erhöhung von Angiotensin II zu erwarten, resultierend in einer Blutdruckerhöhung. Vor endgültigen Schlussfolgerungen wäre es ratsam, die durchgeführten Untersuchungen an Gefäßzellen zu wiederholen. Bei den verwendeten SK-N-SN-Zellen handelte es sich um eine Tumorzelllinie aus Neuroblastomgewebe, somit könnte die Up-Regulierung der Enzyme als Differenzierungsförderung von Tumorzellen sowie die Proliferationshemmung als Hemmung des Tumorzellwachstums interpretiert werden. Diese Wirkung wurde bereits für beide Substanzen für andere Gewebe beschrieben (Übersicht in Escher 2000). Auch für Rotwein wurde eine tumorinhibierende Wirkung an Zellen und Tiemodellen bereits beobachtet (Damianiki et al. 2000, Elattar und Virji 1999, Stoewsand et al. 1991, Clifford et al. 1996). Somit konnte kein weiterer Erklärungsansatz für die protektive Wirkung des Rotweins auf kardiovaskuläre Erkrankungen geliefert werden.

Diese Versuchsauswertungen zeigten, dass allgemein für die Untersuchungen von Polyphenolen, so auch von Birkenblätterextrakten und enthaltenen Flavonoiden und Proanthocyanidinen, die *In-vitro*-Enzymbestimmungen durch Bestimmungen an Zelllinien untermauert werden sollten. Gerade für die Ektoenzyme könnte die Verwendung der membrangebundenen Enzyme, wie sie hauptsächlich im Körper existieren, zu veränderten Ergebnissen der Hemmbarkeit durch Testsubstanzen führen. Ein Vorteil der Zellsysteme besteht auch darin, dass Effekte konzentrationsabhängig betrachtet werden können, unter der genauen Kenntnis der Toxizität für das entsprechende Modell. Ein Nachteil für die Arbeit mit Zellkulturen ist, dass die Wahl der Zelllinie die Ergebnisse entscheidend beeinflussen kann, somit Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen noch schwerer vergleichbar werden, als z.B. schon durch unterschiedliche Wahl von Substraten in Enzymassays. Viele Zelllinien können in der Regel deshalb kultiviert werden, weil sie Tumorzellen mit gesteigerter Teilungsaktivität sind. Gerade für die Interpretation von Effekten sollte der

unterschiedliche Stoffwechsel von gesunden Körperzellen und Geweben zu Tumoren immer beachtet werden. Vorteil der in der eigenen Arbeit zu Birkenblättern verwendeten Bestimmungsmethoden mit isolierten Enzymen ist vor allem der geringere praktische Aufwand, besonders der Verzicht auf sterile Arbeitsweise, so dass bei einer bioaktivitätgeleiteten Fraktionierung von pflanzlichem Material sich zunächst die Anwendung der einfacheren Methode empfiehlt. Im Falle der Auffindung von interessanten Naturstoffen sollten sich unbedingt Untersuchungen an Zellen anschließen.

3.5 Betulinsäure und Betulinol als Inhibitoren der LAP

Von den anderen, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Naturstoffen, die Hemmwirkungen auf die Enzyme NEP, ACE oder LAP aufwiesen, hoben sich Betulinsäure und Betulinol einerseits durch ihre spezifische Wirkung gegenüber LAP, andererseits durch ihre Wirkpotenz als Einzelstoffe in wesentlich geringeren Konzentrationen ab, denn ihre IC_{50} -Werte lagen unter der IC_{50} des bekannten Inhibitors Bestatin.

Die Entdeckung dieses biochemischen Effektes lässt sich nicht für die Erklärung der Wirkungsweise von Birkenblättern nutzen, da die pentacyclischen Verbindungen nicht in diesen Pflanzenteilen, sondern in der Rinde akkumuliert werden. Betulinol stellt den Hauptanteil der Triterpene in der Birkenrinde, neben Lupeol, Betulinsäure u.a. Die Birke war zwar namensgebend für diese Verbindungen, trotzdem sind sie Inhaltsstoffe vieler anderer Pflanzenarten (Djerassi 1994).

Die Hemmung der LAP war ein wichtiges Ergebnis, denn dadurch war es möglich, einen Zusammenhang zwischen bekannten pharmakologischen Effekten der Betulinsäure, wie z.B. der Apoptoseauslösung in Krebszellen, und des als Zytostatikum angewandten LAP-Inhibitors Bestatin (Ubenimex) aufzuzeigen.

Die Experimente von Pisha et al. (1995) an humanen Melanomzellen in Mäusen zeigten, dass Betulinsäure ohne Toxizität das Tumorwachstum durch Apoptoseinduktion unterbrach. Auch gegen Zelllinien verschiedener maligner Hirntumore (Fulda et al. 1999) und gegen Primärkulturen verschiedener humaner Tumore (Nagourney et al. 1996) erwies sich die Betulinsäure aktiv.

Menrad et al. (1993) veröffentlichten, dass an Melanomen und nicht an normalen Melanozyten ein bestimmtes Oberflächenprotein expremiert wird, dessen Sequenzanalyse eine identische Struktur zu LAP (EC. 3.4.11.2) ergab. Die daraufhin erfolgte Behandlung der Melanomzellen mit kompetitiven Inhibitoren des Enzyms (Bestatin, Amastatin) führte zu einer Hemmung der Invasion der Tumorzellen durch die Matrigel-Basalmembran. Ebenso bewirkten LAP-Inhibitoren (Bestatin, Leuhistin, Matlystatin A) bei HT1080-Fibrosarcomzellen eine Hemmung des Abbaus der subendothelialen Matrix (Fujii et al. 1996a). Diese Beobachtungen ließen erkennen, dass die LAP bei der Ausbreitung maligner Tumore eine entscheidende Rolle spielt. An Patienten mit malignen Melanomen konnte in einer klinischen Prüfung (Phase III) für Bestatin eine Verlängerung des rezidivfreien Zeitraumes erreicht werden (Ikeda et al. 1985).

Aufgrund der Literaturlauswertung und der eigenen biochemischen Versuche konnte geschlossen werden, dass die festgestellte LAP-Hemmaktivität das gemeinsame Anti-Melanom-Wirkprinzip beider Verbindungen, Bestatin und Betulinsäure, sein musste.

Weiterhin wirkt Betulinsäure als Inhibitor von Stromelysin und Kollagenase (Sun et al. 1996), so dass über die Hemmung dieser Matrix-Metalloproteinasen ein weiterer Wirkmechanismus zur Verhinderung der Ausbreitung von Tumoren durch Betulinsäure existiert.

Für Betulinsäure konnte als apoptoseeinleitender Mechanismus die Aktivierung der Caspasen festgestellt werden (Fulda et al. 1997). Es besteht kein Widerspruch zwischen der Aktivierung der Metalloproteasen Caspasen und der Hemmung der Metallopeptidase LAP, da die Induktion der Caspasen erst am Ende einer Reaktionsfolge hin zur Apoptose steht (Widmann et al. 1998). Die LAP-Hemmung muss daher ein vorausgehender Mechanismus sein, auf welchen letztendlich indirekt eine Caspase-Aktivierung erfolgen kann.

Neben der Anti-Tumor-Wirkung besitzt Bestatin immunmodulierende Eigenschaften und wurde deshalb zur Immuntherapie unter Aufrechterhaltung der Chemotherapie nach Remission bei Akuter Myeloischer Leukämie angewandt (Tsukagoshi 1987). Bestatin zeigte direkte wachstumshemmende Wirkung auf Leukämie-Zelllinien, sowie additive bzw. synergistische Effekte mit anderen Chemotherapeutika wie Daunomycin, Arabinosylcytosin, Mercaptopurin und Etoposid (Fujii et al. 1996b). Ebenso wie bei den o.g. Melanomzellen konnten Lendeckel et al. (1996) zeigen, dass nur Leukämiezellen LAP exprimieren, während normale Zellen des Myelo-Monozyten-Stammes diese Eigenschaft nicht besitzen. Solche unterschiedlichen Merkmale sind die Voraussetzung für eine selektive Behandlung von Tumorzellen mit Bestatin bzw. Betulinsäure.

Eine weitere wichtige Wirkung von Betulinsäure und deren Derivaten ist eine Anti-HIV-Aktivität, die mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Evers et al. 1996, Kashiwada et al. 1996). Soler et al. (1996) fanden heraus, dass Betulinsäurederivate nicht als HIV-Protease- oder Reverse-Transkriptase-Hemmer wirken, sondern nach der Anheftung der Viren in den Virus-Zell-Fusionsprozess eingreifen. Für Bestatin beschrieben Pulido-Cejudo et al. (1997) analog, dass die Substanz signifikant die Infektion von Zellen mit HI-Viren herabsetzte und LAP eine wichtige Rolle in den frühen Stadien des Virus-Angriffes, beim Eintritt in die Zellen spielt. Damit kann auch bei der zweiten möglichen Indikation für Betulinsäure eine Parallele zu Bestatin bzw. zur LAP-Beeinflussung gezogen werden.

3.6 Resorptionsuntersuchungen am Rattendünndarm-Modell

In letzter Zeit hat das Interesse an biopharmazeutischen Fragestellungen auch für pflanzliche Arzneistoffe und Phytopharmaka sehr stark zugenommen. Gerade bei Substanzen, die *in-vitro* pharmakologische Wirkungen zeigten, musste geklärt werden, wie sie vom Körper aufgenommen, umgewandelt und ausgeschieden werden. Besonders für Flavonoide sind diese Fragestellungen wichtig, da sie in sehr vielen pharmakologischen Testsystemen Aktivität zeigten. Andererseits werden sie täglich über Nahrung zugeführt, so dass auch

diese Zufuhr, die Dosierung von Phytopharmaka und die Wirkkonzentrationen von reinen Flavonoiden verglichen werden müssen.

Für Westeuropäer sind Zwiebeln, Äpfel und Tee die Lebensmittel mit den höchsten Flavonoidgehalten. Die durchschnittliche Aufnahme an Flavonoiden wurde für die Niederlande z.B. mit $41,9 \pm 23,7$ mg/Tag angegeben oder für Dänemark auf 26 mg/Tag geschätzt. Besonders durch die Wahl von Getränken, wie Orangensaft, Fruchtsäfte, Kaffee, Tee und Wein, wurde die Zufuhr aller Polyphenole stark beeinflusst (Hertog et al. 1993, de Vries et al. 1997, Justesen et al. 1997, Scalbert und Williamson 2000).

In einer Vielzahl von Verzehrstudien wurde die Bioverfügbarkeit von Quercetin und seinen Glykosiden untersucht (Übersichten in Scalbert und Williamson 2000 und Gräfe 2000). Die Zusammenfassung einzelner Ergebnisse wird erschwert durch die Anwendung unterschiedlicher Extraktions- und Analyseverfahren der Urin- und Plasmaproben. Weiterhin wird die Bioverfügbarkeit stark von der applizierten Matrix und dem an Quercetin geknüpften Zucker beeinflusst. Ebenso sind die interindividuellen Schwankungen der pharmakokinetischen Daten sehr groß.

Nach dem heutigen Erkenntnisstand findet eine Resorption von Flavonoiden bereits im Dünndarm statt. Die Frage, ob für eine Aufnahme die Spaltung der Glykoside in Quercetin und Zucker notwendig ist, ist noch nicht ausreichend geklärt. Die gastrointestinale Mucosa weist β -Glucosidase-Aktivität zur Spaltung von Quercetin-glucosiden auf (Ioku et al. 1998, Day et al. 1998). Als membran-gebundenes, sich an der Außenseite des Bürstensaums befindendes Enzym wurde die Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) beschrieben (Day et al. 2000b). Für Flavonoide mit einer Rhamnose kann durch diese Enzyme keine Glykosidspaltung erfolgen, so dass im Falle von Rutin oder Quercitrin der bisher für alle Flavonoide angenommene Biotransformationsweg mit einer Zuckerspaltung durch die Mikroflora des Kolons (Bokkenheuser et al. 1987, Kim et al. 1998) und anschließende Resorption angenommen wird. Trotzdem sind interessanterweise die Glykoside Voraussetzungen für eine Resorption, da die orale Zufuhr des Aglykons eine wesentlich schlechtere Aufnahme zur Folge hat (Hollman et al. 1995, Morand et al. 2000).

Nicht erst in der Leber, sondern bereits innerhalb der Enterozyten werden Flavonoide durch die cytosolische β -Glucosidase und die UDP-Glucuronosyltransferase metabolisiert. Im Plasma liegt Quercetin nur in Form von Glucuroniden und mit einer hohen Plasma-Eiweiß-Bindung vor. Der Nachweis von intakten Glykosiden war vermutlich eine Folge einer unzureichenden Selektivität der Analytik. Mehrere Gruppen haben in letzter Zeit bestätigt, nur Glucuronide nachweisen zu können (Wittig et al. 2001, Sesink et al. 2001).

Für die im Plasma gefundenen Konzentrationen an Quercetinkonjugaten seien hier beispielhaft $373 \text{ nM} \pm 61 \text{ nM}$ (10 Probanden nach einer sehr flavonoidhaltigen Mahlzeit, Manach et al. 1998) und $2,3 \text{ } \mu\text{g/ml} \pm 1,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ (ca. $7 \text{ } \mu\text{M}$, 12 Probanden nach dem Verzehr von Zwiebeln entsprechend 100mg Quercetin, Gräfe 2000) aufgeführt. Erst recht die Detektion intakter Flavonoidmoleküle im Harn bedurfte einer hoch empfindlichen Analytik (Young et al. 1999, Gräfe 2000). Weitere nachweisbare Metabolite im Harn sind verschiedene hydroxylierte bzw. methoxylierte Benzoe- und Phenyllessigsäurederivate und 3,4-Dihydroxytoluol (Baba et al. 1981, Pietta et al. 1997, Gräfe 2000).

Zur Aufklärung der Bioverfügbarkeit von Flavonolen wurden zahlreiche *In-vivo*-Versuche an Ratten durchgeführt (z.B. Manach et al. 1997, Piskula und Terao 1998, Choudhury et al. 1999, Pforte et al. 1999). Da besonders die Vorgänge im Gastrointestinaltrakt maßgeblich für die Verfügbarkeit von Flavonoiden verantwortlich waren, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen das Verhalten an Resorptionsmodellen mit Ratten- oder Schweinedarm untersucht (Noteborn et al. 1997, Shimoi et al. 1998, Crespy et al. 1999, Spencer et al. 1999, Gräfe 2000, Gee et al. 2000, Andlauer et al. 2001). Weiterhin wurden an Caco-Zellen die Transportvorgänge genauer untersucht (Walgren und Walle 1999, Murota et al. 2000, Walgren et al. 2000a, Walgren et al. 2000b).

Generell ist ein Vergleich der Ergebnisse kompliziert, z.B. durch Unterschiede in der experimentellen Aufarbeitung des biologischen Materials, die Variation der Zusammensetzung von Donator- und Akzeptormedien und die verschiedene Versuchsdauer. So variierte bei den beschriebenen Modellen der pH-Wert zwischen minimal pH 6,8 (Gräfe 2000) und maximal pH 7,4 (Gee et al.

2000), diese Differenzen können vor allem die Löslichkeit und Stabilität von Quercetin beeinflussen. Da der Calciumgehalt der Medien die Permeabilität der Tight junctions der Epithelzellen beeinflusst (Ma et al. 2000), muss auch die Ionenzusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen beachtet werden. Bei den zitierten Verfahren betrug die Konzentration an Ca^{2+} -Ionen 2 mM bzw. 2,5 mM. Die Inkubationszeit der Darmabschnitte unterschied sich dagegen sehr. Durch die radioaktive Markierung der Flavonoide war es Gee et al. (2000) ermöglicht, die Versuchsdauer auf 15 min zu beschränken, Gräfe (2000) und Noteborn et al. (1997) inkubierten 45 min und 120 min bis zur Versuchsauswertung. Die Inkubationszeit von 180 min der eigenen Untersuchungen wurde von keinem anderen Autor beschrieben. Durch die Kontrolle des Glucose- und des Fluoresceingradienten und die visuelle Beurteilung der Darmabschnitte konnte in den eigenen Versuchen die Integrität und Viabilität der verwendeten Darmsegmente über den Versuchszeitraum sichergestellt werden.

Das in den eigenen Untersuchungen verwendete Modell mit Rattendünndarm (Norta und Schöpke 1996) zeichnet sich dadurch aus, dass die Organstücke nicht weiter verändert wurden. Es wurden keine Wendung (everted sac) durchgeführt oder Teile der Muskelschicht entfernt. Im Verhältnis zur Oberfläche waren die Schnittstellen sehr klein und es wurde mit relativ langen Segmenten gearbeitet, so dass durch die große Resorptionsfläche viel Stoffmenge übertreten konnte und so eine Auswertung der Akzeptorproben mit HPLC-UV ohne Anreicherung der Testsubstanzen möglich wurde.

Die Untersuchungen an diesem Modell ergaben, dass sowohl Hyperosid als auch Rutin resorbiert wurden. Beide Verbindungen wurden unverändert im Akzeptor nachgewiesen. Somit zeigten die Segmente keine nachweisbare metabolische Aktivität. Für Hyperosid konnte dieses Ergebnis mit keinen anderen publizierten Daten verglichen werden, da dieses Flavonoid bisher noch nie in anderen Studien auf sein Resorptionsverhalten untersucht wurde.

Für das zweite Glykosid Rutin liegen mehrere Ergebnisse anderer Autoren vor. Auch bei der Untersuchung mit ca. 9 cm² Schweinedarm unter Verwendung einer Franz-Zelle (Gräfe 2000) wurde unverändertes Rutin, ohne weitere Metabolite, im Akzeptorkompartiment detektiert. Die Untersuchungen an

Rattendarmsegmenten (Andlauer et al. 2001), wobei das Akzeptormedium aus einer Emulsion aus Perfluorotributylamin, Krebspuffer und Pluronic bestand, ergaben nach 60 min einen Nachweis von freiem Rutin (56 %), neben Rutin-glucuronid (20 %) und Rutin-sulfat (24 %) im Akzeptormedium. Nur Spuren an Quercetin, im Bereich der Nachweisgrenze, wurden detektiert (amperometrische Detektion). Die eingesetzte Donatorkonzentration an Rutin betrug bei dieser Arbeitsgruppe ca. 1/8 der Konzentration in den eigenen Untersuchungen. Da allerdings der Flux bezüglich des Trockengewichts des Dünndarms angegeben wurde, war ein quantitativer Vergleich mit den eigenen Daten nicht möglich.

Die Testungen an 15-30 cm langen Rattendünndarmsegmenten, die in einer Kammer mit flüssigem Paraffin eingesetzt und mit Puffer durchspült wurden (Spencer et al. 1999), ergaben für Rutin, im Unterschied zu Quercetin und Quercetin-3-glucosid, keine gleichzeitige Biotransformation und Resorption (HPLC mit Photodioden-Array-Detector). An diesem Modell ist kritisch zu bewerten, dass die Resorption der Verbindungen an das Durchtreten von wässrigem Medium durch das Organ und Durchtropfen durch das Paraffin zum Kammerboden gebunden war. Aufmerksamkeit verdiente allerdings die Untersuchung dieser Autoren, dass auch die Verwendung von Jejunum oder Ileum einen Einfluss auf die Absorption und Metabolisierung zeigte. Besonders deutlich war dieses im Falle der hydrophilen Kaffeesäure, Ferrulasäure und Chlorogensäure. Die Jejunum-Testungen ergaben wesentlich höhere Aufnahmen der Verbindungen in das Akzeptormedium. Für Rutin wurden leider keine vergleichenden Untersuchungen vorgenommen. Im Darm nehmen die Porendurchmesser in den Tight junctions von proximal nach distal ab. Die Fenestrierung ist damit in den oberen Dünndarmabschnitten größer als in den unteren und daher die passive Permeabilität des Epithels bzw. der parazelluläre Transport im Jejunum größer als im Ileum (Thews et al. 1999, Pfeifer et al. 1995). Für die intakten Flavonoidglykoside muss, genau wie für die hydrophilen Kaffeesäurederivate, dieser parazelluläre Transportweg durch die Poren der Tight junctions angenommen werden, da die Moleküle zu hydrophil für eine Diffusion durch die Membran der Epithelzellen sind.

Ein aktiver Transport von Rutin ist unwahrscheinlich. Zwar wurde eine kompetitive Hemmung des natrium-abhängigen Glucosetransporters (SGLT-1)

durch Quercetin-mono-glucoside beobachtet, doch wurde damit für diese Verbindungen nicht sichergestellt, ob sie durch den Carrier in die Zellen hinein transportiert wurden (Gee et al. 2000, Ader et al. 2001). Quercetin und Rutin wechselwirkten nicht mit dem SGLT-1, d.h. der aktive Transport ist für diese Verbindungen erst recht ausgeschlossen. Quercetin-4'-glucosid wurde in Caco-2-Zellen durch SGLT-1 aufgenommen, aber nicht durch die Monolayer hindurch absorbiert (Walgren et al. 2000a). Gleichzeitig war an dieser Zelllinie der Efflux dieses Flavonoids durch das apicale Multidrug-Resistance-Associated-Protein-2 (MRP-2) festgestellt worden (Walgren et al. 2000b), ein Prozess der einer Aufnahme in die Zelle genau entgegengerichtet ist. Die Sekretion glucuronidierten Quercetins zurück in das Lumen eines *in-situ*-perfundierten Rattendarmes wirkte einer Absorption ebenso entgegen (Crespy et al. 1999).

Somit entspricht die Netto-Absorption durch das Epithel des Darmes der Summe der verschiedenen Mechanismen, unter Berücksichtigung der Transportrichtung. Die verschiedenen Modelle lieferten je nach Vorrang des aktiven oder passiven Transportes oder des Effluxes unterschiedliche Absorptionsdaten. Eine große Bedeutung kommt dabei vor allem der Donorkonzentration des untersuchten Flavonoids zu. Bei hohen Konzentrationen, wie in den eigenen Untersuchungen, wird aufgrund des hohen Gradienten der „solvent drag“, d.h. der Stofftransport, der gemeinsam mit dem transmembranalen Wasserfluss durch die Poren der Tight junctions stattfindet, alle anderen Prozesse überlagern.

Im Gegensatz zum Rutin, wäre für Hyperosid (Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid) eine Interaktion mit dem SGLT-1 möglich, da auch D-Galactose Substrat dieses Hexose-Carriers ist. Untersuchungen mit zuckerverknüpftem p-Nitrophenol zeigten, dass das β -D-Galactosid des p-Nitrophenols, im Unterschied zum α -D-Galactosid, aktiv absorbiert wurde (Mizuma et al. 1993). Da p-Nitrophenyl- β -D-galactosid trotzdem hauptsächlich unmetabolisiert auf der Serosa-Seite gefunden wurde, muss es auch Substrat für die basolaterale Glucosepermease sein, um aus den Epithelzellen heraustreten zu können. Die Bedeutung dieses Mechanismus für die Resorption der Flavonoide ist z.Z. noch nicht geklärt.

Da bei den eigenen Untersuchungen beide Flavonoide mit gleicher Resorptionsrate und prozentuaalem Anteil der Resorption in den Akzeptor übertraten, wird der Transportmechanismus durch die Poren der Tight junctions für beide Flavonoide anzunehmen sein.

Die Anwendung des Birkenblätterextraktes führte zu keiner Resorptionsverbesserung des Hyperosids. Da bisher die Aufklärung der Resorptionsmechanismen bei fast allen Autoren im Mittelpunkt stand, wurden bisher nur von Gräfe (2000) *In-vitro*-Untersuchungen von Flavonoiden aus Pflanzenextrakten durchgeführt. Durch Buchweizenkrautpulver nahm der resorbierte Anteil Rutin zu, für Zwiebelextrakt konnte aufgrund von Konzentrationsunterschieden und starkem Metabolismus der Quercetin-glucoside kein Vergleich mit den Reinsubstanzen durchgeführt werden. Bei den eigenen Versuchen wurde die Auswertung auch nur auf das Hyperosid beschränkt, obwohl auch die anderen Quercetin- und Myricetin-Glykoside der Birkenblätter im Akzeptor auffindbar waren. Notwendig wäre aber zur Auswertung aller Flavonoide eine sichere Identifizierung der HPLC-Peaks gewesen. Alternativ wäre eine Berechnung des resorbierten Gesamtquercetins nach Spaltung aller Glykoside vorstellbar.

Ursache für den fehlenden Extrakteinfluss könnte sein, dass unter den angewandten Bedingungen keine lösungsvermittelnden Eigenschaften der Begleitstoffe nötig waren, da bei pH 7,4 Hyperosid im Akzeptormedium löslich war. Weiterhin war vielleicht auch der gewählte Konzentrationsgradient so hoch, dass eine Stabilisierung des Flavonoids vor Oxidation durch andere Polyphenole im Donator und die resultierende Konzentrationserhöhung keine Auswirkung auf die Resorptionsrate hatten. Dieses hätte durch Donatoruntersuchungen geprüft werden können. Als weitere mögliche Interaktionen zwischen Extraktinhaltsstoffen und Dünndarmepithel wären Wechselwirkungen mit der aufliegenden Mucus-Schicht oder eine Veränderung der Tight junction-Permeabilität durch die Änderung der Ca^{2+} -Konzentration, z.B. durch die Bildung schwerlöslicher Salze, vorstellbar.

Ein Vergleich mit publizierten *In-vivo*-Daten ist für Hyperosid und Birkenextrakt nicht möglich. Für Rutin wurden in früheren humanen Studien und Tierversuchen die Flavonoide im Plasma oder Urin nach Konjugatspaltung

detektiert (z.B. Hollman et al. 1995, Manach et al. 1997). Daher blieb die Frage, ob Rutin, wenn es intakt resorbiert werden würde, auch intakt im Plasma vorliegen würde unbeantwortet. Erst die Kopplung von HPLC an ESI-MS (Mauri et al. 1999) oder MS/MS (Wittig et al. 2001) ermöglichte eine Identifikation des Glykosids am Flavonol-Grundkörper. Aktuelle Untersuchungen konnten mit diesen analytischen Methoden kein Rutin im Plasma nachweisen (Gräfe 2000, Erlund et al. 2000). Gerade der Vergleich der pharmakokinetischen Parameter des Plasma-Quercetins nach der Applikation von Rutin bzw. Quercetin oder Quercetin-glucosiden zeigte, dass für Rutin eine verzögerte Absorption durch spätere t_{\max} -Werte eintrat, die auf die Hydrolyse durch die Darmflora und später einsetzende Resorption während der Dickdarmpassage hinweist.

In den eigenen Untersuchungen und in verschiedenen anderen Resorptionsmodellen konnte *in-vitro* die Resorption von intaktem Rutin im Dünndarm nachgewiesen werden. *In-vivo* scheint diese Absorption von Rutin bzw. seiner Abbauprodukte im Dünndarm nicht dominierend für die Gesamtaufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt zu sein, da die nachfolgenden Prozesse im Dickdarm sehr entscheidend sind. Die verwendeten Resorptionsmodelle eignen sich deshalb eher zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen und ihren Zubereitungen, bei denen eine Resorption aus dem Dünndarm gesichert ist und diese in größerem Ausmaß stattfindet, als im Falle der an Zucker geknüpften Flavonoide.

Trotz vieler offener Fragen zur Problematik der Bioverfügbarkeit, soll nicht außer Acht gelassen werden, dass trotzdem gerade für Rutin und seine partial-synthetisch hergestellten Hydroxyethyl-Derivate mehrfach pharmakologische Wirkungen in Doppelblindstudien gezeigt werden konnten (z.B. Koscielny et al. 1996, Rehn et al. 1996), jedoch immer durch Betrachtung einer mehrwöchigen Therapie und leider ohne Beachtung von Plasmaspiegeln von Rutin und eventueller Metaboliten.

3.7 Pilotstudie mit Birkenblätterttee

Durch das gewählte, sehr einfache Untersuchungsverfahren konnte mit der Pilotstudie die diuretische oder aquaretische Wirksamkeit von Birkenblätterttee nach Einmalapplikation am menschlichen Organismus nicht signifikant

nachgewiesen werden. Bei 50 % der 14 Probanden wurde eine Erhöhung des Urinvolumens innerhalb der Versuchsdauer beobachtet. Bei ebenfalls 50 % wurde ein gegensätzlicher Effekt beobachtet.

Es könnte trotz der geringen Zahl an Testpersonen die Hypothese aufgestellt werden, dass die Probanden mit positiver Wirkung Responder darstellen. Wie für viele andere Arzneistoffe wäre auch für Birkenblätter ein individuelles Ansprechen von Patienten oder Probanden auf eine Anwendung vorstellbar. Unter der Annahme, dass die Wirksamkeit der Birkenblätter zumindest zum Teil auf die Hemmung von NEP und ACE zurückzuführen ist, könnte hierfür eine unterschiedliche Enzymausstattung der Personen verantwortlich sein.

Bei der Pilotstudie mit Birkenblättern zeichnete sich genau die Problematik des Wirksamkeitsnachweises anderer flavonoidhaltiger Drogen ab, insbesondere bei der Betrachtung eines diuretischen bzw. aquaretischen Effektes. Im Tierversuch (Schilcher und Rau 1988) gelang ein Wirkungsnachweis, dosisabhängig vermehrte sich die Harnproduktion nach oraler Applikation eines wässrigen Birkenblätterextraktes. Der große Unterschied des eigenen Testverfahrens zum Tierexperiment bestand darin, dass die Testpersonen vor und an den Versuchstagen nicht identischen Umwelteinflüssen ausgesetzt waren, sowie nicht den gleichen Tätigkeiten in den Testzeiten nachgingen. Bis auf den Verzicht von Kaffee und schwarzen Tee am Morgen der Versuchstage wurden im Vorfeld auch keine Einschränkungen zur Zusammensetzung der Ernährung vorgenommen, keine Run-in- bzw. Wash-out-Phasen definiert. Maßnahmen, die eine starke Beeinträchtigung der Lebensweise bedeuten, wären erst bei einer echten klinischen Studie einer großen Probandenzahl zumutbar gewesen, nach Genehmigung durch eine Ethikkommission, Einhaltung von Good Clinical Practice, der Deklaration von Helsinki 1989 sowie des AMG. Ein Beispiel für einen flavonoidfreien Diätplan bei einer klinischen Studie zur Flavonoid-Resorption aus Buchweizenkraut und Zwiebeln, der ebenfalls für eine Wirksamkeitsprüfung von Flavonoiddrogen anzuwenden wäre, kann Gräfe (2000) entnommen werden.

Ein weiterer Grund für die fehlenden Unterschiede zwischen Verum- und Kontroll-Urinvolumina in der Pilotstudie könnte die Dosierung der Droge sein. Zum einen wurde die Droge nur einmal angewendet, die ESCOP-Monographie

empfiehlt eine zwei bis dreimal tägliche Einnahme der Birkenblätterzubereitung. Zum anderen wäre die Betrachtung eines längeren Anwendungszeitraumes, der für den Wirkungseintritt sehr vieler Phytopharmaka einzuhalten ist, wichtig für weitere Untersuchungen der Birkenblätter. So wurde eine klinische Studie zum Wirksamkeitsnachweis von Buchweizentee mit einer Prüfphase von 12 Wochen durchgeführt (Koscielny et al. 1996). Die Besonderheit dieser Studie lag darin, dass kein Pflanzenextrakt, sondern wie im Fall der eigenen Pilotstudie ein Tee einer Flavonoid-Droge, Gegenstand der Untersuchungen war. Auch die Herstellung mit 200 ml Wasser und die Dosierung mit 1,8 g Buchweizenkraut mit mindestens 4 % Rutin war dem eigenen Verfahren sehr ähnlich. Aufgrund der Indikation des Handelspräparates Fagorutin-Buchweizen-Tee® als Antiödematosum war hier allerdings nicht die Urinausscheidung, sondern das Unterschenkelvolumen die Zielgröße dieser Studie. Hier wurde eine Wirksamkeit nachgewiesen mit Probanden, die an chronischer venöser Insuffizienz litten. Ebenso konnten auch Milewicz et al. (1994) bei Probandinnen mit Ödemen die Effekte eines aus Birkenblättern, Hauhechelwurzel und Bohnenhülsen zusammengesetzten Phytopharmakons feststellen. Hier diente das 24-Stunden-Sammelurinvolumen als Zielparameter, nach 7 Tagen Medikation änderte sich der Wert von 1130 ± 319 ml auf 1735 ± 331 ml. Diese Studie zeigte, welche großen Streuungen bei der Erfassung des Urinvolumens auftreten.

Die Probanden bei der selbst durchgeführten Pilotstudie mit Birkenblätterttee wiesen weder Verschiebungen in der Homöostase noch Bluthochdruck auf, so dass die Drogenzufuhr auch deshalb vielleicht nicht zu einer signifikanten Flüssigkeitsausscheidung führen konnte. Die Wirkung der Droge zur Durchspülung bei bakteriellen und entzündlichen Erkrankungen der ableitenden Harnwege, dürfte aber nicht an diese pathophysiologischen Bedingungen geknüpft sein.

Die Angabe eines ausgeschiedenen Flüssigkeitsvolumens ist als klinischer Parameter allein wenig geeignet. Für die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen muss ein Mindestharnvolumen von 0,5 l pro Tag gebildet werden. Der minimale Wasserbedarf eines Erwachsenen im Mitteleuropa beträgt 1,5 l pro Tag, da zusätzlich zur Harnbildung ein Verlust von 0,9 l pro Tag durch Verdunstung unvermeidlich ist (Thews et al. 1999). Das Harnvolumen des

Organismus ist nicht die Größe, die durch Regelmechanismen kontrolliert wird, sondern sekundäre Folge der Regulationen der osmotischen Konzentrationen im Extrazellularraum, des Blutvolumens und -druckes über die Na^+ -Ausscheidung und des Säure-Base-Haushaltes. Für die Funktionsprüfung der Niere nutzt man das Harnzeitvolumen auch nur unter der gleichzeitigen Angabe von Substanzkonzentrationen in Urin und Plasma zur Berechnung von glomerulärer Filtrationsrate bzw. Clearance.

Wenn die kurzzeitige Anwendung von Birkenblätterttee bei gesunden Probanden nicht zu einer erhöhten Flüssigkeitsausscheidung führte, wäre es auch im Sinne der gewünschten Durchspülung der Harnwege, wenn ein zu Placebo gleiches Harnvolumen schneller gebildet werden würde. Durch die beschleunigte Ausscheidung und die erneute Zufuhr eines Getränks als Reaktion auf den einsetzenden Durstreiz würde insgesamt eine vermehrte Flüssigkeitsaufnahme und -ausscheidung stattfinden. Dieser erhöhte Flüssigkeitsumsatz pro Zeit würde genau dem Therapieziel Durchspülung der Harnwege entsprechen. Die zusätzliche Aufnahme von Flüssigkeit während der Testzeit wurde in der durchgeführten Pilotstudie aus Gründen der konstanten, übersichtlichen Versuchsbedingungen nicht gestattet, obwohl Probanden über Durstgefühl berichteten. Deshalb ist die o.g. Hypothese zum Wirkmechanismus des Birkenblätterttees mit den vorliegenden Probandendaten noch nicht zu bewerten. Generell sollte also nicht das absolute Harnvolumen, sondern die Urinbildung in Abhängigkeit von der Zeit unter Medikation und Placebo verglichen werden. Daher wurde bei Pilotstudie nicht nur das Gesamtvolumen dokumentiert, dass innerhalb der vierstündigen Versuchszeit ausgeschieden wurde, sondern bereits die Zeitintervalle zur Leerung der Harnblase eingeführt. Wie unter den Ergebnissen aufgeführt, war bei sechs Probanden das Ausscheidungsvolumen bereits in den ersten 60 min der Testphase nach Birkenblätterttee erhöht, so dass in diesen Fällen eine weitere Zufuhr von Tee oder auch Wasser sicherlich zu noch stärkerer Harnausscheidung im Beobachtungszeitraum geführt hätte.

Im folgenden soll die gegenwärtige Situation der Wirksamkeitsnachweise anderer Drogen, die die gleiche Indikation wie Birkenblätter besitzen, dargestellt werden. Für die Droge *Orthosiphonis folium* wurde im Tierversuch mit Ratten (Englert und Harnischfeger 1992) ebenso nach Einmalapplikation

konzentrationsabhängig ein diuretischer Effekt nachgewiesen. Eine placebokontrollierte Doppelblindstudie mit traditionellen vietnamesischen Heilpflanzen, zu denen auch *Orthosiphon* zählt, konnte trotz der scharfen Rahmenbedingungen für die Testpersonen nach der Einmalapplikation bei einer Dosierung entsprechend 10 g Blattdroge als Heißwassermazerat wiederum keine signifikante Steigerung des 12- oder 24-Stunden-Harnvolumens oder der Na^+ -Ausscheidung zeigen (Doan et al.1992).

Ebenso wurden bisher für andere harntreibende, flavonoidhaltige Drogen die Wirksamkeit nur mit tierexperimentellen Daten (Ratten) belegt. Extrakte von *Solidago*-Arten wurden zusammen mit denen von Birkenblättern von Schilcher und Rau (1988) untersucht, ein Fertigarzneimittel von *Solidago gigantea* Ait. (Urol mono[®]) durch Leuschner (1995) als wirksam eingestuft. Auch *Ononis spinosa* L. wurde, wie die Birkenblätter, bisher noch nicht durch humane Studien untersucht. Auch hier führten Tierversuche zur positiven Bewertung der Droge (z.B. Rebuelta et al. 1981, Hilp 1976). Einen Überblick zu Publikationen über Equiseti herba gibt Veit (1994), auch für diese Droge ist eine Bewertung durch die vorhandenen Ergebnisse schwierig.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass der Nachweis einer Steigerung der Harnproduktion für pflanzliche Arzneimittel wenig erfolgversprechend zu sein scheint, da gerade das Urinvolumen sich nicht als zuverlässiger Parameter für klinische Studien eignet. Sicherlich wurden im Rahmen des Zulassungsverfahrens von Phytopharmaka weitere Studien oder zumindest Anwendungsbeobachtungen durchgeführt, diese Daten sind dann aber selten für die wissenschaftliche Öffentlichkeit zugänglich.

So könnten die Problematik des Urinvolumens an sich, die Vertraulichkeit von Zulassungsdaten sowie sicherlich auch die geringe Anerkennung der Veröffentlichung von Negativ-Ergebnissen den Mangel an modernen klinischen Studien zu pflanzlichen Aquaretika erklären.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 Bezugsquellen von Substanzen und Biochemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Bezug, Firma</u>
Acacetin	Sigma
β -Aescin	Merck
Aesculetin	Fluka
Alizarin	Aldrich
7-Amino-4-methylcumarin (AMC)	Serva
Apigenin	Sigma
Baicalein	Aldrich
Bestatin	Sigma
Betulinol	Roth
Betulinsäure	Roth
(\pm)-Catechin	Sigma
Chlorogensäure	Roth
Chrysin	Sigma
Cyanidinchlorid	Roth
Dammar-23(E)-en-12-O-acetyl-3 α ,12 β ,20(S),25-tetrahydroxy-3-(hydrogen-propandioat)	Prof. K.-W. Glombitza, Bonn
Dammar-24-en-12-O-acetyl-3 α ,12 β ,17 α ,20(S)-tetrahydroxy-3-(hydrogen-propandioat)	Prof. K.-W. Glombitza, Bonn
Dammar-24-en-12-O-acetyl-3 α ,12 β , 20(S)-trihydroxy-3-(hydrogen-propandioat)	Prof. K.-W. Glombitza, Bonn
3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure	Prof. P.G.Pietta, Mailand
Diosmin	Sigma
Earle's Balanced Salts, modified (Zusammensetzung in g/l: CaCl ₂ ·2H ₂ O: 0,265, Mg ₂ SO ₄ : 0,09767, KCl: 0,4, NaCl: 6,8, NaH ₂ PO ₄ : 0,122, D-Glucose: 1,0)	Sigma
Eberseminalplasma	Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V.
Ellagsäure	Roth
(-)-Epicatechin	Roth
(-)-Epigallocatechin (EGC)	Roth

(-)-Epigallocatechingallat (EGCG)	Sigma
Eriocitrin	Roth
Fisetin	Fluka
Flavon	Sigma
Ginsenosid-Rd	Roth
Glucose Procedure No. 115	Sigma
β-Glucuronidase EC 3.2.1.31 Typ H2	Sigma
Glycyrrhetinsäure	Merck
HEPES, hemisodium salt	Sigma
Hesperetin	Sigma
Hesperidin	Sigma
Hippuryl-His-Leu-OH * 4 H ₂ O	Bachem
Homoorientin	Roth
3-Hydroxyphenylessigsäure	Prof. P.G.Pietta, Mailand
4-Hydroxyphenylessigsäure	Prof. P.G.Pietta, Mailand
Hypericin	Roth
Hyperosid	Merck
Isoquercitrin	PD Dr. G.Bader, Berlin
Isorhamnetin	Roth
Kämpferol	Sigma
Kaffeesäure	Sigma
Leucine Aminopeptidase, microsomal, EC 3.4.11.2 Typ IV-S	Sigma
Leucin-p-nitroanilid *HCl	Sigma
Lisinopril	Sigma
Luteolin	Sigma
3-Methoxy-4-hydroxyphenylessigsäure	Prof. P.G.Pietta, Mailand
4-Methylcatechol	Prof. P.G.Pietta, Mailand
Morin	Sigma
Myricetin	Sigma
Naringenin	Sigma
Naringin	Sigma
Oleanolsäure	Roth

Oleuropein	Roth
Ononin	Roth
Phosphoramidon	Serva
Phthaldialdehyd	Merck
Quercetin	Sigma
Quercetin-3-arobopyranosid	Dr. B.Gehrmann, Hamburg
Quercetin-3-glucuronid	Dr. B.Gehrmann, Hamburg
Quercitrin	Sigma
Resveratrol	Sigma
Rhamnetin	Roth
Rosmarinsäure	Roth
Rutin	Sigma
Saponinum album (aus <i>Gypsophila</i> - sp.)	Merck
Sinensetin	Roth
N-Succinal-Ala-Ala-Phe-7-Amido-4-methylcumarin	Sigma
Vitexin	Roth

4.2 Extraktherstellung

4.2.1 Pflanzenmaterial

Im Juni 1996 wurden Blätter von *Betula pendula* Roth in Berlin-Wuhlheide gesammelt. Die Droge wurde abgedunkelt bei Raumtemperatur getrocknet. Alle Versuche in dieser Arbeit wurden mit diesem Pflanzenmaterial durchgeführt.

4.2.2 Wässriger Birkenextrakt

50 g pulverisierte Droge wurde mit 500 ml siedendem, destilliertem Wasser versetzt. Danach wurde der Ansatz ohne weitere Erwärmung für zwei Stunden gerührt, anschließend die wässrige Lösung dekantiert und unter Verwendung einer Tinkturenpresse das Drogenmaterial ausgepresst. Um verbleibende Drogenpartikel aus der vereinigten wässrigen Lösung zu entfernen, wurde kurz zentrifugiert. Die Gefriertrocknung des Flüssigextraktes ergab 10,4 g Trockenextrakt (DEV 4,8 : 1).

4.2.3 Extrakte mit organischen Lösungsmitteln

4.2.3.1 Petrolether und Ethylacetat

350 g pulverisierte Droge wurden in Teilansätzen zu 50 g mit jeweils 750 ml Petrolether für 2 Stunden in einer Soxhlet-Apparatur entfettet. Anschließend erfolgte unter gleichen Bedingungen die Extraktion mit 750 ml Ethylacetat pro Teilansatz. Nach Entfernen der Lösungsmittel wurden 20 g Petroletherextrakt (DEV 17,5 : 1) und 41 g Ethylacetatextrakt (DEV 8,5 : 1) erhalten.

4.2.3.2 80%iges Methanol

Das nach Petrolether- und Ethylacetatextraktion verbliebene Drogenmaterial wurde je Teilansatz zu 70 g dreimal mit 1000 ml 80%igem Methanol für eine Stunde unter Rückfluss extrahiert. Das Lösungsmittel wurde durch Einengen am Rotationsversampfer und abschließende Gefriertrocknung entfernt. Die Ausbeute an getrocknetem Methanolextrakt betrug 83 g (DEV 4,2 : 1).

4.2.4 Aceton-Wasser-Extrakt für den Proanthocyanidinnachweis

Nach Hiermann et al. (1986) wurden 10 g gepulverte Birkenblätter viermal mit je 150 ml einer Aceton-Wasser-Mischung (70/30) für 15 min bei Raumtemperatur unter Rühren extrahiert. Nach Filtrieren wurde aus der Extraktlösung das Aceton am Rotationsverdampfer bei 30°C entfernt. Die verbliebene Lösung wurde einmal mit 500 ml Ether ausgeschüttelt und anschließend die Etherphase mit 200 ml Wasser gewaschen. Die Gefriertrocknung der vereinigten Wasserphasen ergab 2,9 g Extrakt (DEV 3,4 : 1).

4.3 **Arzneibuchmethoden zur Gehaltsbestimmung**

4.3.1 Flavonoidgehalt von Birkenblättern und Heißwasserextrakt

Nach der Monographie Birkenblätter (Ph.Eur.-Nachtrag 2000) wurde der Gesamtflavonoidgehalt, berechnet als Hyperosid bestimmt. Die gesammelte Droge (Einwaage 0,2034 g) entsprach mit einem Gehalt von 2,2 % den Anforderungen des Arzneibuchs. Für den Heißwasserextrakt (Einwaage 0,0508 g) ergab sich ein Gehalt von 3,7 %.

4.3.2 Gerbstoffgehalt von Birkenblättern und methanolischem Extrakt

Nach der Monographie Ratanhiawurzel (Ph.Eur.) wurde der Gerbstoffgehalt mit veränderter Einwaage bestimmt. Für das Drogenmaterial (Einwaage 1,5 g) ergab sich ein Gehalt von 4,51 % und für den methanolischen Extrakt (Einwaage 0,346 g) ein Gehalt von 21,1 %.

4.4 Dünnschichtchromatographie

DC-Material: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten auf Aluminiumfolie, Fa. Merck
(10x10 cm)

Fließmittelsysteme:

Flavonoide

- | | | |
|----|---|---------------|
| I | Ethylacetat : Ethylmethylketon : Wasser :
Ameisensäure | 5 : 3 : 1 : 1 |
| II | Toluol : Ethylacetat : Methanol | 11 : 8 : 1 |

Triterpene

- | | | |
|-----|---|--------------|
| III | Chloroform : Methanol : Wasser (Unterphase) | 10 : 1 : 0,5 |
| IV | Chloroform : Methanol | 8,5 : 1,5 |
| V | Chloroform : Hexan : Essigsäure | 4,5 : 3 : 1 |

Catechin und Proanthocyanidine

- | | | |
|------|--|---------------|
| VI | Ethylacetat : Hexan : Ether : Essigsäure 98% | 4 : 2 : 2 : 2 |
| VII | Ethylacetat : Eisessig : Wasser (Oberphase) | 10 : 2 : 3 |
| VIII | Ethylacetat : Methanol : Wasser | 20 : 7 : 3 |
| IX | Ethylacetat : Methanol : Wasser | 12 : 5 : 3 |

Detektion:

Flavonoide

Naturstoffreagenz: Nach dem Trocknen bei 110°C wird die noch warme Platte mit einer 1%igen Lösung (m/V) von Diphenylboryloxyethylamin in Methanol und anschließend einer 5%igen Lösung (V/V) von

Macrogol 400 in Methanol besprüht. Die Auswertung erfolgt nach etwa 30 min unter UV₃₆₅. Flavonoide zeigen eine gelb-orange, z.T. auch grüngelbe Fluoreszenz, Kaffeesäure und Chlorogensäure sind durch türkisblaue Zonen erkennbar.

Triterpene

Anisaldehyd-Reagenz: Die getrocknete Platte wird mit einer Lösung von 0,5 ml Anisaldehyd in 10 ml 98%iger Essigsäure, 85 ml Methanol und 5 ml 96%iger Schwefelsäure besprüht und 10 min bei 110°C erhitzt. Die Auswertung erfolgt im Tageslicht. Triterpene erscheinen als purpurne bis violette Zonen auf der Platte.

Catechin und Proanthocyanidine

Echtblausalz-Lösung: Die getrocknete Platte wird mit einer frisch hergestellten Lösung von 50 mg Echtblausalz B in 10 ml Wasser besprüht und anschließend mit Ammoniak bedampft. Die Auswertung erfolgt im Tageslicht (rotbraune Zonen).

Vanillin-Phosphorsäure-Reagenz: Die getrocknete Platte wird mit einer Lösung von 100 mg Vanillin in 100 ml 50%iger Phosphorsäure besprüht und 10 min bei 110°C erhitzt. Die Auswertung erfolgt im Tageslicht (rötliche Zonen).

4.5 Auftrennung von Extrakten durch Säulenchromatographie

4.5.1 Auftrennung des methanolischen Extraktes

26 g des methanolischen Extraktes wurden in 400 ml Wasser aufgenommen und in zwei Teilansätzen dreimal mit je 150 ml wassergesättigtem n-Butanol ausgeschüttelt. Das Einengen der organischen Phase am Rotationsverdampfer ergab 9,4 g Butanolextrakt und die Gefriertrocknung der Wasserphase 15,2 g Extrakt. Der Butanolextrakt wurde in wenig Methanol aufgenommen und in 150 ml Ether getropft. Der entstandene Niederschlag wurde mehrmals mit Ether

gewaschen, bis nach Verdunsten der Lösungsmittelreste ein Pulver (Rohglykosidgemisch, RGG) entstand. Die Masse des Pulvers betrug 5,0 g. Die Rückrechnung auf die Ausgangsdroge ergab eine Ausbeute an RGG von 4,5 % bzw. ein DEV von 22 : 1.

Durch Säulenchromatographie mit 200 g Sephadex LH-20 in einer Glassäule (75 cm x 5cm) mit Methanol als Fließmittel wurde das RGG aufgetrennt. Es wurden Fraktionen a 40 ml gesammelt und diese nach DC (Fließmittel I) hinsichtlich ihrer Flavonoidzusammensetzung vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Mit der HPLC wurden nachträglich die Aussagen zur Identität der Flavonoide in den Fraktionen konkretisiert (s. Tabelle 5, S.20).

Tabelle 33: Vereinigung der Fraktionen des MeOHExtr. nach SC an Sephadex LH-20 (DC-Fließmittel I, Naturstoffreagenz)

	Fraktionen	Masse (g)	R _F auf DC	Zuordnung durch DC
A	1-10	1,332	--	
B	11-14	1,283	0,45	
C	15-20	0,299	0,54; 0,64	<i>Chlorogensäure</i>
D	21-25	0,408	0,57	Hyperosid
E	26-28	0,219	0,67; 0,57; 0,51	3 Flavonoide
F	29-37	0,370	0,51; 0,43	2 Flavonoide (0,51>>0,43)
G	38-39	0,096	0,50; 0,41	2 Flavonoide (0,50< 0,43)
H	40-42	0,104	0,41	Flavonoid
J	Nachlauf	0,526	--	

Tabelle 34: Reaktion der Fraktion J des MeOHExtr. mit verschiedenen mit Detektionsmitteln

Reagenz:	Naturstoff-	Anisaldehyd-	Vanillin-Phosphorsäure-
	negativ	braun	rot

DC-Fließmittel I, R_F 0,0 (Startfleck)

Tabelle 35: DC der Fraktion **J** des MeOHExtr (Detektion: Vanillin-Phosphorsäure-Reagenz)

Fließmittel		R _F -Bereich
EthAc : MeOH	2 : 8	0,0
EthAc : MeOH	8 : 2	0,0
EthAc : MeOH : Ameisensr.	8 : 2 : 0,5	0,0-0,9*
EthAc : MeOH : NH ₃	8 : 2 : 0,5	0,0
EthAc : MeOH : Ameisensr.	5 : 5 : 0,5	0,4-1,0*
EthAc : MeOH : Ameisensr.	2 : 8 : 0,5	0,6-1,0*

* unscharfe Banden über die gesamte Laufstrecke

4.5.2 Auftrennung des Ethylacetatextraktes

Die DC des Ausgangsmaterials EthacExtr. hinsichtlich der enthaltenen Dammaranverbindungen ist in folgender Übersicht zusammengefasst:

Tabelle 36: DC des EthAcExtr. (DC-Fließmittel **IV**, Anisaldehyd-Reagenz)

Referenz	R _F	EthAcExtr.
Dammaranester 1	0,50	+
Dammaranester 2	0,40	+
Dammaranester 3	0,38	+
Betulinol	0,86	-

+ enthalten, - nicht erkennbar, zusätzlich Triterpenzonen detektiert im R_F-Bereich 0,55-0,15

2,9 g des Ethylacetatextraktes wurden durch Säulenchromatographie (Säule 54 cm x 4 cm) mit 280 g Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm) aufgetrennt. Als Fließmittel dienten nach Rickling und Glombitza (1993) Chloroform-Methanol-Mischungen (Verhältnis 100/0 bis 50/50). Mit DC (Fließmittel **III**) wurden die Fraktionen (50 ml) auf ihren Triterpengehalt untersucht. Die Vereinigung (23-30) enthielt Triterpene neben Chlorophyll, die Fraktionen (31-41) Triterpene neben Flavonoiden.

Tabelle 37: Charakterisierung der Fraktionen des Ethylacetatextraktes nach SC an Kieselgel (DC-Fließmittel III, Anisaldehyd-Reagenz)

CHCl ₃ /MeOH	Fraktionen	Masse (g)	R _F auf DC	Zuordnung
100/0	Vorlauf	0,043	Roter Bereich an Front	Ätherisches Öl,
100/0	1-8	0,184	0,96	oberes Chlorophyll
90/10	9-14	0,039	0,43	gelbe Farbstoffe
90/10	15-17	0,235	Zwischenfraktion	
80/20	18-22	0,425	0,33	unteres Chlorophyll
80/20	23-30	0,481	0,14; (0,33)	Triterpe (+ Chlorophyll)
70/30	31-41	1,122	0,14; (0,00)	Triterpe (+ Flavonoid)
70/30	42-47	0,331	0,00	Flavonoide
50/50	Nachlauf			Flavonoide

Mit den vereinigten Fraktionen (23-30) wurde eine weitere Trennung an Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm) durchgeführt, mit 0,434 g Material, 50 g Kieselgel in einer Säule (40cm x 2,5 cm) und der Oberphase einer Chloroform-Methanol-Wasser-Mischung (10:1:0,5) als Fließmittel. Die Charakterisierung der Fraktionen (1-224 a 7 ml; 225-245 a 40 ml; 246-250 a 50 ml) erfolgte mit DC-Methode IV. Zum Eluieren der Flavonoide wurde ab Fraktion 230 die Polarität des Fließmittels schrittweise erhöht, bis die Säule mit reinem Methanol gespült wurde.

Tabelle 38: Charakterisierung der Fraktionen nach zweiter SC an Kieselgel mit Ethylacetat-Fraktion (23-30) (DC-Fließmittel **IV**, Anisaldehyd-Reagenz)

	Fraktionen	Masse (g)	Triterpene (R_F)*	weitere R_F auf DC	Zuordnung
Vergleich			0,50		Dammaranester 1
<i>A</i>	1-10	0,031	--	--	
<i>B</i>	11-23	0,028	--	0,70; 0,54	beide Chlorophyll
<i>C</i>	24-32	0,020	--	0,64; 0,54	Chlorophyll, unbekannt
<i>D</i>	33-44	0,052	0,5	0,54	Chlorophyll
<i>E</i>	45-54	0,032	0,5	0,54; 0,44	beide Chlorophyll
<i>F</i>	55-81	0,058	0,5; 0,2	0,54; 0,44; 0,31	zwei Chlorophylle + Substanz, die tiefblau fluoresz. (366nm)
<i>G</i>	82-154	0,093	0,3 > 0,2		
<i>H</i>	155-230	0,053	0,3 < 0,2		
<i>J</i>	231-235	0,035	0,2	0,0	Flavonoid
<i>K</i>	236-248	0,020	--	0,0	Flavonoid
<i>L</i>	249-Ende	0,028	--	0,0	Flavonoid

* Zonen auseinandergezogen, daher R_F nur mit einer Kommastelle angegeben

Im Fließmittel **IV** besaßen die Dammaranester 1-3 dicht beieinanderliegende R_F -Werte, deshalb wurde die DC der vereinigten Fraktionen und der Vergleichssubstanzen mit dem Fließmittel **V** wiederholt.

Tabelle 39: Vergleich der R_F -Werte der Fraktionen aus mit DC-Fließmittel **V** und **IV**

	Fließmittel V	Fließmittel IV
Dammaranester 1	0,50	0,50
Dammaranester 2	0,43	0,40
Dammaranester 3	0,24	0,38
<i>D</i>	0,5	0,5
<i>E</i>	0,5	0,5
<i>F</i>	0,5; 0,1	0,5; 0,2
<i>G</i>	0,2; 0,1	0,3; 0,2
<i>H</i>	0,2; 0,1	0,3; 0,2
<i>J</i>	0,1	0,2

Mit beiden Laufmitteln wurden drei Hauptzonen von Triterpenen detektiert, in der Zone mit dem höchsten R_F (*D-F*) könnte Dammaranester 1 enthalten sein. Dammaranester 3 würde sich in den Fraktionen mit mittleren R_F -Gebieten befinden (*G, H*). Die Laufhöhe der unteren detektierten Triterpene (*F-J*) lag unterhalb der vorhandenen Vergleichssubstanzen. Die Identität des Flavonoids das zum Ende der Säule eluiert wurde, wurde mit den Fließmitteln **I** und **II** als freies Quercetin bestimmt.

Die Anreicherung der Triterpene konnte über den Anstieg des DEV verfolgt werden:

Tabelle 40: DEV-Berechnungen für die Aufarbeitung des Ethylacetatextraktes

	Droge	Extrakt	DEV
Ausgangsmaterial EthacExtr.	350g	41g	8,5 : 1
1.SC mit 2,9g EthacExtr.	25g	2,9g	
(23-30)+(31-41) Summe der triterpenhaltigen Fraktionen	25g	1,603g	16 : 1
(23-30) Triterpene + Chlorophyll	25g	0,481g	52 : 1
(31-41) Triterpene + Flavonoide	25g	1,122g	22 : 1
2.SC mit 0,434g (23-30) aus 1 SC	22,6g	0,434g	
(D-J) Summe der triterpenhaltigen Fraktionen	22,6g	0,323g	70 : 1
(G+H) Summe der saubersten Triterpenfraktionen	22,6g	0,146g	155 : 1
G	22,6g	0,093g	243 : 1
H	22,6g	0,053g	426 : 1

4.6 Charakterisierung der Birkenblätter als Gerbstoffdroge

4.6.1 Catechin

1,0 g pulverisierte Birkenblätter wurden entsprechend der Identitätsprüfung der Gerbstoffdroge Tormentillwurzelstock (DAB 1999) behandelt. Nach Ausschütteln der wässrigen Extraktlösung mit Ethylacetat und Einengung der organischen Phase, wurde mittels DC qualitativ das Vorkommen von Catechin überprüft.

Tabelle 41: Nachweis von Catechin in Birkenblättern (Fließmittel **VI**, Detektion Echtblausalz)

	Referenz (Catechin)	Frischer Extrakt nach Identitätsprüfung Tormentill	MeOHExtr.
R _F	0,77	0,77	negativ

Bei beiden Extrakten wurden im unteren Drittel (R_F 0,1-0,3) weitere, in einander übergehende rotbraune Zonen detektiert.

4.6.2 Proanthocyanidine

Der Aceton-Wasser-Extrakt (s. Kapitel 4.2.4) wurde mittels DC nach Hiermann et al. (1986) und Wagner und Bladt (1996) hinsichtlich des Vorkommens von OPC und PPC untersucht.

Tabelle 42: Nachweis von Proanthocyanidinen im Aceton-Wasser-Extrakt aus Birkenblättern (Detektion: Vanillin-Phosphorsäure-Reagenz)

Fließmittel	R _F von Proanthocyanidinen*	R _F Hyperosid
VII (OPC)	0,9 0,4 0,15 0,08 0,0	0,48
VIII (OPC)	0,9 0,8 0,5 0,1 0,0	0,78
IX (PPC)	0,9 0,6 0,4 0,2 0,0	0,82

* Zonen unscharf, daher R_F z.T. nur mit einer Kommastelle angegeben; Proanthocyanidine ergeben rot-braune, Flavonoide grün-braune Banden, zur Unterscheidung von Flavonoiden und Proanthocyanidinen wurde separat mit Naturstoff-Reagenz detektiert

4.7 HPLC-Analyse von Flavonoiden

Es wurde mit einer LC10-Anlage der Fa. Shimadzu (Auto Injector SIL-10A; zwei Pumpen LC-10AD; Column Oven CTO-10AC; UV-VIS-Detector SPD-10AV; Communication Bus Module CBM-10A) gearbeitet. Die Lösungsmittel wurden in HPLC-Qualität verwendet und über den Degaser DG-1210 (VDS-Optilab) den Pumpen zugeführt.

Ausgehend von Schneider-Leukel 1994 wurden unter folgenden Bedingungen die Flavonoidglykoside der Birke identifiziert bzw. quantifiziert:

Säule : LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) 250-4 (Fa. Merck)
 Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) 4-4 (Fa. Merck)
 Säulentemperatur: 30°C
 Flussrate: 1 ml/min
 Fließmittel A: 90 %(V/V) 0,45 N H₃PO₄; 10 %(V/V) ACN
 Fließmittel B: 10 %(V/V) 0,45 N H₃PO₄; 90 %(V/V) ACN
 Gradient: 0 min 5% B; 40 min 40%B; 45 min 5%B; 50 min Stop
 Detektion: 254 nm

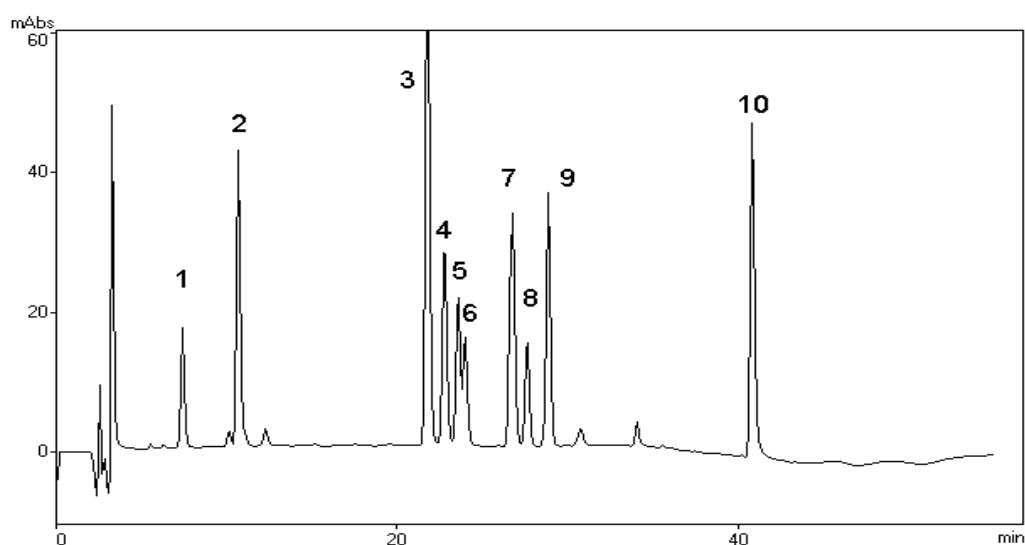


Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm einer Lösung der Referenzsubstanzen (s. Tabelle 43)

Tabelle 43: HPLC-Retentionszeiten und relative Retentionen der Referenzsubstanzen

Nr.	Substanz	t_R in min	α_{Hyp}	α_{Nar}
1	Chlorogensäure	7,3	0,32	0,27
2	Kaffeesäure	10,6	0,47	0,39
3	Rutin	21,6	0,96	0,79
4	Hyperosid (Quercetin-3-galactosid)	22,7	--	0,83
5	Isoquercitrin (Quercetin-3-glucosid)	23,4	1,03	0,85
6	Quercetin-3-glucuronid	23,9	1,05	0,87
7	Guajaverin (Quercetin-3-arabopyranosid)	26,0	1,15	0,95
8	Naringin	27,5	1,21	--
9	Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid)	28,7	1,27	1,05
10	Quercetin	40,7	1,80	1,48

α_{Hyp} , α_{Nar} : relative Retentionen bzgl. Hyperosid bzw. Naringin

Tabelle 44: Analytische Charakterisierung der verwendeten HPLC-Methode

	typische Kalibrierung für 10µl Injektionsvolumen *	Regressionkoeffizient r^2	Nachweisgrenze
Hyperosid M _r 464	A = 28499 c - 712	0,9998	0,8 ng
Rutin·3 H ₂ O M _r 664	A = 21679 c + 835	0,9982	
Quercetin·2 H ₂ O M _r 338	A = 44402 c - 557	0,9992	1,8 ng

* A: Peakfläche [µAbs·s] für c [µg/ml]

Zur Gehaltsbestimmung wurden die Birkenblätterextrakte in dem geeigneten Lösungsmittel (ca. 2 mg/ml) gelöst und die Analysenlösung durch ein Rotilabo-Spritzenfilter (13 mm PTFE 0,45 µm) filtriert.

Heißwasserextrakt: 50%iges Methanol

Methanolextrakt: Methanol

Ethylacetatextrakt: Anlösen in Ethylacetat, auffüllen mit Methanol

4.8 Enzymbestimmungen

4.8.1 Puffer und Testsubstanzlösung

Für die NEP- und LAP-Bestimmungen wurde folgende HEPES-Pufferlösung verwendet:

HEPES, hemisodium salt	12,5 g
NaCl	9,0 g
Aqua bidest. (sterilisiert)	ad 1000,0 ml
	pH 7,4

Für die ACE-Bestimmung wurde ein Phosphatpuffer (Friedland und Silverstein 1976) hergestellt:

Stammlösung:

$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	87,09 g
NaCl	87,67 g
Aqua bidest. (sterilisiert)	ad 1000,0 ml
	pH 8,3

Verdünnung für Enzymbestimmung:

Stammlösung + Aqua bidest. (sterilisiert)	1 + 3,6
---	---------

Die Testsubstanzen und Extrakte wurden in Methanol bzw. DMSO gelöst und mit dem entsprechenden Puffer verdünnt, wobei die Testlösung maximal 20 % (10 µl) DMSO oder 40 % (20 µl) Methanol enthielt. Der Einfluss des Lösungsmittels wurde in den Kontrollen berücksichtigt.

4.8.2 Statistik

Alle Messwerte wurden als Doppelbestimmung ausgeführt und die Versuche jeweils mindestens zweimal wiederholt. Die Berechnung der Hemmwerte aus den Messwerten wird bei den Enzymbestimmungsmethoden angegeben. Die IC_{50} -Werte wurden durch lineare Regression aus Enzymhemmungswerten bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen ermittelt.

4.8.3 Bestimmung der NEP-Hemmung

Die Bestimmung basierte auf der von Melzig et al. (1996) beschriebenen, zweistufigen Methode mit N-Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-Amido-4-methylcumarin (SAAP-AMC) als Substrat. Während der ersten Reaktion setzte NEP aus dem Substrat Phe-AMC frei, das in einer weiteren enzymatischen Reaktion durch Leucin-Aminopeptidase-Zugabe (LAP) zu AMC abgebaut wurde, dessen Konzentration fluorimetrisch bestimmt werden konnte.

50 µl einer Testlösung wurden mit 50 µl Lisinopril (8 µM) und 50 µl Substrat (400 µM) versetzt und mit HEPES-Puffer auf 350 µl ergänzt. Durch Zugabe von 150 µl Eberseminalplasma (1:1000 verdünnt) wurde die Reaktion gestartet und die Ansätze wurden für 60 min bei 37°C inkubiert. 50 µl Phosphoramidon (50 µM) beendeten die Reaktion. Die Zugabe von 20 µl LAP (1:235 verdünnt), die zeitgleich zur ersten Reaktionszeit bei 56°C vorinkubiert worden war, startete die zweite Reaktion zur Bildung von AMC. Die Ansätze wurden dabei für 60 min bei 56°C inkubiert. Durch 900 µl Aceton wurde die Reaktion durch Proteindenaturierung gestoppt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 13.000 U/min wurde die Fluoreszenz der Ansätze bei Anregungswellenlänge 367 nm, Emissionswellenlänge 440 nm und Spaltbreiten 3 nm gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu).

Zeitgleich wurde je Testwert ein Leerwert, der 50 µl Phosphoramidon (50 µM) schon zur ersten Inkubation enthielt, mitgeführt. Weiterhin wurde zur Überprüfung, ob die Testlösung den zweiten Reaktionsschritt beeinflusst, eine Kontrolle mitgeführt, der die Testlösung erst vor der LAP-Zugabe hinzugesetzt wurde. Um falsch positive Hemmergebnisse auszuschließen, die sich insbesondere bei Flavonoiden durch Wechselwirkung mit der Fluoreszenzmessung (Absorption bei 367 bzw. 440 nm) ergeben, erhielt ein weiterer Kontrollwert die Testlösung erst vor Reaktionsabschluss durch Aceton. Um Volumengleichheit bei allen Proben zu gewährleisten, wurde allen Proben zum jeweiligen Zeitpunkt entweder 50 µl Testlösung oder 50 µl HEPES-Puffer hinzugefügt.

Berechnung der NEP-Hemmung:

L	Leerwert, messbare Fluoreszenzeinheiten, die nicht auf NEP-Aktivität beruhen
M_1	Messwert der Probe mit Testlösung vor 1. Reaktion
M_2	Messwert der Probe mit Testlösung vor 2. Reaktion
M_3	Messwert der Probe mit Testlösung nach Reaktionsende
$F_1 = M_1 - L$	AMC-Fluoreszenz durch verbliebene NEP- und LAP-Aktivität
$F_2 = M_2 - L$	AMC-Fluoreszenz, bei 100 % NEP- und verbliebener LAP-Aktivität
$K = M_3 - L$	AMC-Fluoreszenz bei 100 % Aktivität beider Enzyme, 100%-Kontrolle

Für die Gesamthemmung (%) der aufeinanderfolgenden Enzymreaktionen galt:

$$(1) \quad I_{Ges} = I_{NEP} + I_{LAP} - \frac{I_{NEP} * I_{LAP}}{100\%}$$

Aus den Messwerten (M_1 , M_2 , M_3 und L) ließ sich dann nach Berechnung von Gesamt- und LAP-Hemmung die NEP-Hemmung nach Gleichung (4) ermitteln:

$$(2) \quad I_{Ges} = 100\% - \frac{F_1}{K} * 100\% \quad \text{Gesamthemmung [\%]}$$

$$(3) \quad I_{LAP} = 100\% - \frac{F_2}{K} * 100\% \quad \text{LAP-Hemmung [\%]}$$

$$(4) \quad I_{NEP} = \frac{(I_{Ges} - I_{LAP})}{100\% - I_{LAP}} * 100\% \quad \text{NEP-Hemmung [\%],}$$

Umstellung Gleichung (1)

4.8.4 Bestimmung der NEP-Hemmung von Extrakten nach Hautpulverbehandlung

0,075 g Hautpulver wurden mit 1,5 ml MeOH Extr. (1,6 mg/ml) bzw. HWE extr. (10 mg/ml) versetzt. Die Ansätze wurden, wie bei der Gerbstoffbestimmung, eine Stunde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur geschüttelt. Durch Zentrifugation (5 min, 13000 U/min) der Probengefäße wurden die Überstände als Testlösungen für die höchsten Konzentrationen erhalten. Alle weiteren Konzentrationen wurden durch Verdünnung dieser Stammlösungen hergestellt. Die Enzymtestung erfolgte wie im vorherigem Abschnitt beschrieben.

4.8.5 Bestimmung der NEP-Aktivität im Urin

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie in Kapitel 4.8.3 beschrieben. Die Urinproben wurden 1 : 50 mit HEPES-Puffer verdünnt. In Reaktionsgefäßen wurden 150 µl Puffer, 50 µl Lisinoprillösung (8 µM) und 150 µl Urinverdünnung vorgelegt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl SAAP-AMC (400 µM) gestartet. Für jede Urinprobe wurde ein Leerwert mitgeführt, zu dem bereits vor dem Reaktionsstart 100 µl Phosphoramidon (25 µM) zugegeben worden waren. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Phosphoramidon (100 µl; 25 µM) beendet. Zur Fluoreszenzentwicklung wurden jeweils 20 µl einer LAP-Lösung (1:235 verdünnt) hinzugefügt und weitere 60 min bei 56°C inkubiert. Nach Abbruch der Reaktion durch jeweils 900 µl Aceton wurden die Ansätze nach Zentrifugation fluorimetrisch vermessen (Excitation 367 nm, Emission 440 nm, Spaltbreiten 3 nm).

Die Enzymaktivitätsberechnung der Urinprobe erfolgte nach Kalibrierung der Fluoreszenz des Reaktionsproduktes 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) im entsprechenden Lösungsmittel HEPES-Puffer/Aceton.

Berechnung der NEP-Aktivität im Urin:

Kalibrierung AMC: $F = a * c_{AMC} + b$

$$a = 0,6583; b = - 4,3088; r^2 = 0,9973; c_{AMC} [\text{nmol/l}]$$

T Fluoreszenzmesswert der Urinprobe

L Fluoreszenzleerwert der Urinprobe

$F = T - L$ AMC-Fluoreszenz der Urinprobe

A_{ges} NEP-Aktivität der Gesamtprobe [U = $\mu\text{mol/min}$]

A_{assay} NEP-Aktivität des Urinvolumens im NEP-Assay [U = $\mu\text{mol/min}$]

V_{Probe} Volumen der Urinprobe [ml]

$$(1) \quad A_{\text{ges}} = \frac{A_{\text{assay}}}{0,003\text{ml}} * V_{\text{Probe}} \quad 150 \mu\text{l (1:50 Urin) entspr. 0,003 ml Urin}$$

$$(2) \quad A_{\text{assay}} = \frac{c_{AMC} * V_{\text{assay}}}{60\text{min}} = \frac{F - b}{a} * \frac{1420}{60} \mu\text{l/min}$$

Nach folgender Gleichung wurde aus der Fluoreszenz und dem Volumen der Probe die Gesamt-NEP-Aktivität [U] errechnet:

$$(2) \rightarrow (1) \quad A_{\text{ges}} = V_{\text{Probe}} * (11,9837 * F + 51,6355) * 10^{-6} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{ml}}$$

4.8.6 Bestimmung der ACE-Hemmung

Die Messungen wurden nach der Vorschrift von Melzig et al. (1996) durchgeführt. Das Enzym ACE katalysierte dabei die Bildung von His-Leu aus Hip-His-Leu. Nach Ende der Reaktionszeit bildete das Dipeptid mit o-Phthalaldehyd einen fluoreszierenden Komplex, dessen Emission als Maß für die Enzymaktivität benutzt wurde.

Zu 50 µl Testlösung wurden 30 µl Puffer, 150 µl Eberseminalplasma (1:300 verdünnt) sowie 20 µl Substrat hinzugefügt. Die Konzentration Hip-His-Leu betrug 24 mmol/l in Wasser, erst durch Erwärmen auf ca. 60°C wurde die Substrat-Suspension zu einer Lösung, die in die Proben pipettiert wurde. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1,00 ml 0,4 N NaOH gestoppt. Nach Zugabe von 100 µl einer frisch hergestellten methanolischen o-Phthalaldehydlösung (20 mg/ml) wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur im dunkeln belassen. Danach wurde durch 300 µl 2 N Salzsäure neutralisiert und nach 30 min Wartezeit (Raumtemperatur, Lichtschutz) und 10 min zentrifugieren (13.000 U/min) die Fluoreszenz der Proben bei Anregungswellenlänge 365 nm, Emissionswellenlänge 500 nm und Spaltbreiten 3 nm gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu). Wie auch bei der NEP-Bestimmung wurde pro Testwert eine Kontrolle mitgeführt, der die Testlösung erst nach dem Stoppen der Enzymreaktion hinzugefügt wurde. Alle weiteren Proben erhielten anstelle der Testlösung 50 µl Puffer. Die Leerwerte einer Messreihe erhielten zur ACE-Hemmung vor dem Start der Enzymreaktion 10 µl einer Lisinoprillösung (25 µM). Aus Test-, Kontroll- und Leerwert wurde wie folgt die Enzymhemmung berechnet:

Berechnung der ACE-Hemmung:

L Leerwert, messbare Fluoreszenzeinheiten, die nicht auf ACE-Aktivität beruhen

M_1 Messwert der Probe mit Testlösung vor Enzymreaktion

M_2 Messwert der Probe mit Testlösung nach Reaktionsende

$F = M_1 - L$ Fluoreszenz durch verbliebene ACE-Aktivität

$K = M_2 - L$ Fluoreszenz bei 100% ACE-Aktivität, Kontrolle

$$I_{ACE} = 100\% - \frac{F}{K} * 100\% \quad \text{ACE-Hemmung [\%]}$$

4.8.7 Bestimmung der LAP-Hemmung

Die Enzymaktivität der LAP wurde in Anlehnung an Gillespie et al. (1992) bestimmt. 100 µl Testlösung wurden mit 250 µl Leucin-p-Nitroanilid (2 mM) versetzt, die Ansätze mit 100 µl HEPES-Puffer ergänzt und mit 50 µl Enzymlösung (1:5000 verdünnte Lösung, entspr. ca. 2 mU) wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 800 µl Aceton beendet, die Ansätze 10 min zentrifugiert (13.000 U/min) und die Absorption des gebildeten p-Nitroanilins (pNA) in den Proben bei 405 nm vermessen (UV- 2101 PC UV-VIS Spectrophotometer, Fa. Shimadzu, Spaltbreite 2 nm). Es wurde für jede Testlösung ein Leerwert mitgeführt, der keine Substratlösung, sondern 250 µl Puffer erhielt. Als Kontrolle der Enzymreaktion diente ein Ansatz ohne Testlösung. Die Eigenabsorption des Substrates wurde durch einen Blindwert ohne Enzymzusatz kontrolliert. Aus den Messwerten wurde wie folgt die LAP-Hemmung berechnet:

Berechnung der LAP-Hemmung:

L_T	Leerwert, Absorption von Testlösung und Enzym (ohne Substrat)
L_K	Leerwert für Kontrolle (ohne Testlösung, ohne Substrat)
M_T	Messwert der Probe (mit Testlösung, Substrat und Enzym)
M_K	Messwert der Kontrolle (mit Substrat und Enzym, ohne Testlösung)
B	Blindwert, Absorption des Substrates (ohne Testlösung und Enzym) (alle Messwerte gegen Puffer-Aceton 500 µl+800 µl)
$K = M_K - L_K - B$	Absorption des pNA bei 100 %LAP-Aktivität, Kontrolle
$T = M_T - L_T - B$	Absorption des pNA bei verbliebener Enzymaktivität

$$I_{LAP} = 100\% - \frac{T}{K} * 100\% \quad \text{LAP-Hemmung [\%]}$$

4.9 Resorptionsuntersuchungen am isolierten Rattendünndarm

4.9.1 Aufbau und Funktionsweise der Apparatur

Die Untersuchungen zur Resorption wurden mit dem an der Humboldt-Universität entwickelten *In-vitro*-Perfusionsmodell (Norta und Schöpke 1996) durchgeführt.

Nach vorschriftsmäßiger Tötung einer männlichen Wistarratte (Tierzucht Schönwalde GmbH, Berlin) durch Dekapitation wurden drei etwa 10-15 cm lange Dünndarmsegmente entnommen und nach einer Vorspülung in die Apparaturen eingesetzt (s. Abbildung 22).

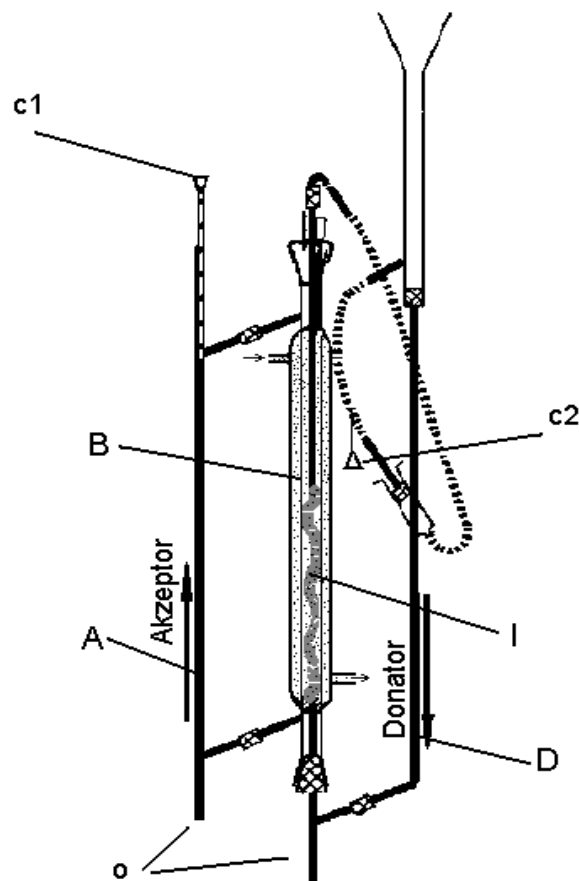


Abbildung 22: Resorptionsmodell (nach Norta und Schöpke 1996)

A: Akzeptorkreislauf, **B:** Wassergefüllte Ummantelung zur Temperierung, **D:** Donatorkreislauf, **I:** Rattendünndarmsegment, **c1:** Kanüle 1 (Akzeptorkreislauf), **c2:** Kanüle 2 (Donatorkreislauf), **o:** Ablassöffnungen

Durch das Darmsegment wurden in der Apparatur die zwei Kompartimente Donator und Akzeptor von einander getrennt. Beide bestanden anfänglich aus einer Pufferlösung von Earle's Balanced Salts (pH 7,4) inklusive 1,0 g/l Glucose. Durch Begasung mit Carbogen (95 % O₂ / 5 % CO₂) durch zwei Kanülen zirkulierten die Flüssigkeiten in den Kreisläufen in entgegengesetzter Richtung. Die Temperierung der Apparaturen auf 37°C erfolgte durch das Umströmen mit Wasser in einem Außenmantel. Nach einer 20minütigen Spülphase wurden die Pufferlösungen abgelassen und durch frische Pufferlösung, die beim Donator zusätzlich die Untersuchungssubstanz und Glucose (2,0 g/l) enthielt, aufgefüllt. Über einen Zeitraum von 180 min wurden Proben von 2 ml aus dem Akzeptor entnommen und das entsprechende Volumen als Puffer mit 1,0 g/l bzw. 2,0 g/l Glucose dem Kompartiment zurückgeführt. Nach dem Ende der Versuchszeit wurden die Akzeptor- und Donatorlösungen abgelassen und deren Volumina bestimmt, sowie die Darmsegmente aus den Apparaturen herausgenommen und deren Längen vermessen.

4.9.2 Kontrolle von Viabilität und Integrität der Darmsegmente

4.9.2.1 Glucose-Bestimmung

Die Glucosekonzentration in den Akzeptorproben wurde enzymatisch mit einem Hexokinase-Assay (Sigma Glucose Procedure No. 115) bestimmt. Nach der Gebrauchsanleitung wurden 20 µl Probe mit 1,0 ml Reagenz versetzt. Nach Zugabe von 5,0 ml 0,1 N Salzsäure erfolgte photometrisch bei 520 nm die Messung der Absorption des gebildeten reduzierten Iodonitrotetrazoliumchlorids (INTH). Die Konzentrationen der Proben wurden über Einbeziehung einer Standardglucoselösung berechnet.

Blieb die Glucosekonzentration in den Akzeptormedien über die Versuchsdauer von 180 min konstant bei 1,0 g/l, konnte auf die Integrität und einen fehlerfreien Einbau der Darmsegmente geschlossen werden.

Die Empfindlichkeit der Meßmethode war nicht ausreichend, um einen Anstieg der Glucosekonzentration im Akzeptor während des Versuches zu verzeichnen.

Auch bei Veränderung der Glucosekonzentrationsverhältnisse von Donator zu Akzeptor auf 7,0 g/l zu 1,0 g/l und 2,0 g/l zu 0,1 g/l blieben die Messwerte beim Ausgangswert. Es gelang nicht, mit der gewählten Messmethode über die Funktion des Glucose-Na-Symports die Viabilität der Darmsegmente direkt nachzuweisen.

4.9.2.2 Fluoreszenz-Messung

Nach 150 min Versuchszeit wurde den Donatormedien 50 µl einer Lösung von Fluorescein-Na (50 mg/l) zugesetzt. Durch Fluoreszenzvergleich von Akzeptor und Donator nach Versuche wurde aufgrund eines Gradienten von mindestens 1:100 die Integrität der verwendeten Darmsegmente mit einem weiteren Verfahren nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz der Lösungen wurde mit dem Spectrofluorophotometer RF-5001 PC (Fa. Shimadzu) bei Anregungswellenlänge 493 nm und Emissionswellenlänge 512 nm (Spaltbreiten jeweils 1,5 nm, Sensitivity high) bestimmt.

Bei den Extraktuntersuchungen mussten die Lösungen vor der Vermessung jeweils 1:10 verdünnt werden, da die starke Absorption des Extraktes die Fluoreszenz in der originalen Donatorlösung stark herabsetzte.

4.9.2.3 Visuelle Beurteilung

Neben der Messung von Parametern zur Beurteilung der Viabilität, war die Beobachtung der Darmsegmente während der Versuchszeit sehr aussagefähig. Ein vitaler Darmabschnitt zeichnete sich durch seine leichten ondulatorischen Bewegungen und deutlich erkennbare, rote Blutgefäße aus. Eine Bildung von zirkulierenden Flusen im Donator im Laufe des Experiments galt als Zeichen der Schädigung der Mucus-Schicht, Ergebnisse der Akzeptoranalyse eines solchen Segmentes mussten dann von der Gesamtauswertung ausgeschlossen werden.

4.9.3 Probenaufbereitung und Flavonoidbestimmung

Die 2 ml entnommenen Akzeptorprobe wurden durch ein 0,45 µm PTFE-Spritzenfilter (Rotilabo®) filtriert. Um die Stabilität der Flavonoide während der Analysenvorgänge zu gewährleisten, wurde zu 1000 µl Filtrat 25 µl einer 1 N Salzsäure zugesetzt und damit der pH-Wert von 7,4 auf 4,8-5,1 herabgesetzt.

Anschließend erfolgte eine qualitative und quantitative Analyse der Akzeptorproben hinsichtlich ihres Flavonoidgehaltes mittels HPLC (Methode s. Kapitel 4.7). 20 bzw. 50 µl der angesäuerten Proben wurden pro HPLC-Lauf injiziert. Um die Identität der Peaks als Hyperosid bzw. Rutin abzusichern, wurden die Lösungen bei Wiederholungen der HPLC-Analyse mit Hyperosid, Rutin und/oder Isoquercitrin gespiket.

Nach Klärung der Peakidentität wurden Kalibrierungen mit den entsprechenden Flavonoiden durchgeführt und der Gehalt der Proben bestimmt.

4.9.4 Mathematische Berechnungen zu den resorbierten Substanzen

Bei der Berechnung der resorbierten Substanzmengen aus den Probenkonzentrationen wurde durch eine Korrekturformel der durch die Entnahme vorangegangener Proben entstandene Stoffmengenverlust berücksichtigt. Aus der korrigierten Probenkonzentration konnte anschließend die resorbierte Substanzmenge (Masse oder Stoffmenge), die Resorptionsquote F_n [%] und die Resorptionsraten R_n bzgl. der Segmentlängen berechnet werden.

Mathematische Berechnungen zu den Resorptionsuntersuchungen:

c_n^*	gemessene Konzentration der Probe n
c_n^k	korrigierte Konzentration der Probe n
V_{Pr}	Probenvolumen [2ml]
V_{Akz}	Akzeptorvolumen [ml]
m_n^k	resorbierte Masse bei n-ter Probe
m_0	Masse der Substanz im Donator
F_n	Resorptionsquote [%] bei n-ter Probe
R_n	Resorptionsrate [nmol/cm] bei n-ter Probe
M	molare Masse
L	Segmentlänge [cm]

$$c_n^k = c_n^* + \frac{V_{Pr}}{V_{Akz}} \sum_{i=1}^{n-1} c_i^*$$

$$m_n^k = c_n^k * V_{Akz}$$

$$F_n = \frac{m_n^k}{m_0} * 100\%$$

$$R_n = \frac{m_n^k}{M * L}$$

4.9.5 Stabilität der Testsubstanzen

2000 µl von Lösungen der im Resorptionsmodell zu untersuchenden Substanzen wurden für 3 Stunden im Wasserbad bei 37°C belassen. Als Lösungsmittel wurde Earle's Balanced Salts (pH 7,4) verwendet. Als Konzentrationen wurden für Hyperosid 0,150 mg/ml, Rutin 0,225 mg/ml und den Heißwasserextrakt 5,0 mg/ml gewählt. Alle 60 min wurden jeweils 100 µl Probe entnommen, mit 900 µl Methanol versetzt und durch HPLC der Gehalt der Flavonoide bestimmt.

Tabelle 45: Stabilität von Hyperosid und Rutin bei 37°C in Earle's Balanced Salts (pH 7,4)

Gehalt in % nach	Hyperosid 0,150mg/ml	Extrakt 5,0mg/ml	Rutin 0,225mg/ml
0	100	100 (Hyperosid)	100
60min	95 ± 2	96 ± 2	100 ± 2
120min	92 ± 5	96 ± 2	101 ± 1
180min	83 ± 5	92 ± 3	100 ± 2

Für die Prüfung von Quercetin wurde 1,5 mg Substanz mit 10,0 ml auf 37°C temperiertem Resorptionspuffer versetzt, die Suspension für 5 min mit Ultraschall behandelt und die weitere Zeit im Wasserbad unter Lichtausschluss bei 37°C belassen. Nach den in Tabelle 46 angegebenen Zeiten wurden Proben zu 1 ml entnommen und filtriert. 500 µl Filtrat wurden mit 200 µl Methanol versetzt und das in Puffer gelöste Quercetin über HPLC bestimmt.

Tabelle 46: Stabilität von Quercetin (150 µg/ml) bei 37°C in Earle's Balanced Salts (pH 7,4)

	c [µg/ml]	c [%]
15min	5,47 ± 0,13	100
30min	4,04 ± 0,32	74
60min	3,46 ± 0,17	63
120min	2,60 ± 0,25	48
180min	2,15 ± 0,19	39

4.10 Pilotstudie zum Wirksamkeitsnachweis von Birkenblättern

4.10.1 Studienplan der Pilotstudie

- Anzahl der Probanden: 8 weibliche und 6 männliche gesunde Probanden im Alter von 22-45 Jahren
- Prüfpräparate:
- a) 200 ml Leitungswasser
 - b) Birkenblätterttee, zubereitet aus 2,0 g Droge und 200 ml siedendem Wasser, 10 min ziehen lassen
- Studiendauer: 2 Tage, jeweils vormittags vier Stunden
- Studienablauf:
- morgens Verzicht auf harntreibende Getränke (Kaffee oder schwarzer Tee)
 - nach vollständig entleerter Blase Einnahme des Prüfgetränks
 - während der Versuchsdauer von 4 Stunden keine weitere Nahrungs- oder Flüssigkeitsaufnahme
 - vollständige Blasenentleerung mit Urinprobe nach 30, 60, 90, 120, 180 und 240 min

4.10.2 Gemessene Parameter

Von den Urinproben der Probanden wurden folgende Parameter bestimmt:

- Volumen: Bestimmung durch Probanden mit Mensur (100 ml und 250 ml)
- NEP-Aktivität: s. Kapitel 4.8.5
- Elektrolytgehalt: s. Kapitel 4.10.3

4.10.3 Elektrolytbestimmung mit Atomabsorptionsspektroskopie

Der Gehalt an Natrium und Kalium wurde am Atom-Absorptions-Spektrophotometer 400 (Fa. Perkin-Elmer) bestimmt.

Natrium: 589,0 nm, Spalt 0,7 nm, Integrationszeit 0,5 s

linearer Bereich 50-250 µM

Kalium: 766,5 nm; Spalt 2,0 nm, Integrationszeit 2 s

linearer Bereich 25-150 µM

Die Urinproben wurden mit demineralisiertem Wasser (100 µl + 10,0 ml, 50 µl + 20,0 ml bzw. 25 µl + 20,0 ml) so verdünnt, dass sich die Werte im direkt zuvor bestimmten, kalibrierten Bereich befanden. Vor jeder Einzelmessung wurde so lange mit demineralisiertem Wasser gespült, bis die Anzeige des Gerätes wieder am Nullpunkt angelangt war.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der modernen Phytotherapie wird die Anwendung der traditionellen Arzneidroge Birkenblätter (*Betulae folium*) zur Durchspülung der Harnwege bei Entzündungen und Nierengrieß, sowie als Zusatzmedikation bei der Behandlung bakterieller Infektionen der Harnwege empfohlen. Als wirksamkeitsmitbestimmende Inhaltsstoffe gelten die in der Droge enthaltenen Flavonoide vom Flavonoltyp mit der Hauptkomponente Hyperosid. Die Gehaltsanforderungen der Arzneibücher betreffen diese Inhaltsstoffgruppe. Phytochemisch wurden die Birkenblätter auch hinsichtlich anderer Stoffgruppen, wie z.B. Triterpene, Gerbstoffe oder ätherisches Öl bereits gut untersucht. Eine harntreibende Wirkung konnte tierexperimentell nachgewiesen werden. Aufgrund des fehlenden Einflusses auf den Elektrolythaushalt wurde für die Birkenblätter und andere pflanzliche Drogen die treffendere Bezeichnung Aquaretika eingeführt, um sie von Wirkung und Indikation der synthetischen Diuretika abzugrenzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Birkenblätterextrakte mit den Lösungsmitteln Heißwasser, 80%iges Methanol und Ethylacetat hergestellt, phytochemisch charakterisiert und auf ihre Hemmaktivität gegenüber Metallopeptidasen untersucht. Im Mittelpunkt der biochemischen Testungen stand die Neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11), da im Organismus eine Hemmung dieses Enzyms über die Konzentrationserhöhung der natriuretischen Peptide zu einer verstärkten Harnausscheidung führt. Alle Schritte der Auftrennung des Extraktmaterials wurden unter der Beobachtung der NEP-Hemmung durchgeführt. Aufgrund der physiologischen Verknüpfung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit der Regulation des Wasserhaushaltes durch die natriuretischen Peptide wurde als weiteres Enzym das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE, EC 3.4.15.1) in die Untersuchungen eingeschlossen. Als drittes zinkhaltiges Ektoenzym, dass am Abbau von Peptidhormonen beteiligt ist, wurde die Leucin-Aminopeptidase (LAP, EC 3.4.11.2) für die Testung von Birkenblätterextrakten, -fraktionen und reinen Naturstoffen, insbesondere phenolischer Verbindungen, ausgewählt.

Der methanolische Extrakt erwies sich als stärkster Inhibitor der drei Metallopeptidasen (NEP: IC_{50} 55 μ g/ml, ACE: max. 54 % bei 1,25 mg/ml, LAP: IC_{50} bei 0,5 mg/ml). Im Ethylacetat- und Heißwasserextrakt befanden sich ebenfalls Inhaltsstoffe, die gegenüber NEP und ACE aktiv waren.

Für eine bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung wurde zunächst der aktivste methanolische Extrakt ausgewählt. Durch Aufarbeitung und Säulenchromatographie wurden Fraktionen gewonnen, in denen die verschiedenen Flavonoide der Birkenblätter angereichert vorlagen. Die NEP-Untersuchungen ergaben hier aber, dass die Auftrennung des Extraktes zu keiner erhöhten Wirkung von Fraktionen gegenüber dem Enzym führte. Die stärkste Hemmaktivität von allen Fraktionen besaß die Fraktion, in der keine Flavonoide, sondern Proanthocyanidine enthalten waren. Ebenso wurde der Ethylacetatextrakt, in dem sich die Triterpene (Dammaranester) aus dem Pflanzenmaterial befanden, durch wiederholte Säulenchromatographie fraktioniert. Wie bei dem methanolischen Extrakt ergab der Vergleich von Hemmeigenschaften und dem Droge-Extrakt-Verhältnis der Einzelfraktionen, dass der Gesamtextrakt den Wirkstoff darstellte und nicht eine einzelne aufgereinigte Substanz oder Substanzgruppe. Hinsichtlich der Hemmeffekte auf die untersuchten Metallopeptidasen konnte die Charakterisierung der Flavonoide als wirksamkeitsmitbestimmende Komponenten der Birkenblätter bestätigt werden. Nach den eigenen Untersuchungen kann die Wirkung der Birkenblätter auch auf den Gehalt an weiteren Polyphenolen, insbesondere den oligomeren Proanthocyanidinen (OPC), zurückgeführt werden.

Die Aktivität der untersuchten Metallopeptidasen wurde durch Extrakte anderer Arzneipflanzen ebenfalls beeinflusst. So waren die methanolischen Auszüge aus *Solidago virgaurea* L. gegenüber NEP aktiv, wobei dieser Effekt eher auf enthaltene Flavonoide und Phenolcarbonsäuren als auf Saponine zurückzuführen war. Proanthocyanidinreiche Extrakte aus *Crataegus*-sp. zeigten Hemmaktivitäten gegenüber NEP, ACE und LAP und bestätigten indirekt die Bedeutung der OPC der Birkenblätter an der Gesamtaktivität der Birkenblätterextrakte. Die Hemmungen der Metallopeptidasen durch Extrakte aus Grünem Tee bestätigten die Wechselwirkung von Catechin-Verbindungen mit den untersuchten Enzymen. Durch besonders hohe Aktivität zeichnete sich

die Verbindung Epigallocatechingallat aus (NEP: IC₅₀ 30 µmol/l bzw. 14 µg/ml), auf deren Gehalt die Extrakte eingestellt worden waren.

Als Schlussfolgerung aus den Untersuchungen dieser Extrakte ergab sich, dass die durch Birkenblätter festgestellte Hemmung von Metallopeptidasen nicht spezifisch für diese Droge ist, sondern dass auch andere, flavonoid- und polyphenolhaltige Arzneipflanzen mit den verwendeten Bestimmungsmethoden Aktivität aufweisen können. Diese Enzymhemmungen könnten auch für deren Wirksamkeitserklärungen in Betracht zu ziehen sein.

In einem breit angelegten Screening mit reinen Naturstoffen wurden zunächst systematisch Flavonoide der verschiedenen Grundtypen und Substituierungsmuster auf ihre Hemmaktivität gegenüber den Metallopeptidasen untersucht. Die wichtigsten Schlussfolgerungen aus der Auswertung der Versuchsreihen waren, dass das Ausmaß der Enzymhemmung von der Anzahl der freien phenolischen OH-Funktionen bestimmt wurde und dass die Flavonoidaglyka aktiver waren als die im Pflanzenmaterial vorliegenden glykosidischen Verbindungen (NEP: Myricetin IC₅₀ 42 µmol/l, Quercetin IC₅₀ 192 µmol/l, Hyperosid max. 24 % bei 300 µmol/l).

Anschließend wurde das Screening auf Flavonoidmetabolite, Catechin-Derivate sowie weitere phenolische Naturstoffe ausgeweitet. Hervorzuheben ist die besonders hohe Aktivität von Cyanidinchlorid (NEP: IC₅₀ 32 µmol/l) und Epigallocatechingallat (NEP: IC₅₀ 30 µmol/l), einer phenolischen Komponente des Grünen Tees. Viele andere Naturstoffe, besonders mit OH-Gruppen in *ortho*-Position, zeigten einen schwachen Einfluss auf die Enzymaktivitäten, mit Hemmungen unter 50 % bei der maximalen Konzentration von 300 µmol/l. Gerade diese weniger starken Einzeleffekte könnten insgesamt trotzdem einen Beitrag zur Wirkung eines Gesamtextraktes leisten. Neben den genuinen Inhaltsstoffen der Extrakte können die durch Biotransformation entstehenden Aglyka und Phenolcarbonsäure-Derivate ebenfalls pharmakologische Effekte auslösen.

Eine Untersuchungsserie mit verschiedenen Triterpenen führte dazu, dass die in der Birkenrinde vorkommenden Verbindungen Betulinsäure und Betulinol als starke Inhibitoren der LAP erkannt wurden. Deren IC_{50} -Werte ($7,3 \pm 1,4$ bzw. $8,8 \pm 1,78 \mu\text{mol/l}$) lagen unter der IC_{50} ($16,9 \pm 4,1 \mu\text{mol/l}$) des bekannten Inhibitors Bestatin. Diese Inhibition ließ sich nicht für die Erklärung der Wirkungsweise von Birkenblättern nutzen, aber es konnten wichtige Zusammenhänge zwischen bekannten pharmakologischen Effekten, wie der Anti-Tumor-Wirkung, Apoptoseauslösung oder Anti-HIV-Aktivität, von Betulinsäure und Bestatin aufgezeigt werden.

Da Flavonoide in vielen Testsystemen *in-vitro* pharmakologische Wirkungen zeigten und nicht nur über Arzneipflanzen oder Phytopharmaka, sondern auch mit der Nahrung zugeführt werden, sind besonders für diese Inhaltsstoffgruppe Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von großer Wichtigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurden die Resorptionseigenschaften von Hyperosid, dem Hauptflavonoid der Birkenblätter, und Rutin mit einem *In-vitro*-Perfusionsmodell am Rattendünndarm untersucht. Für Hyperosid lagen bisher noch keine publizierten Ergebnisse über die Absorption und Biotransformation vor. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass sowohl Rutin als auch Hyperosid unverändert als Glykoside durch den Dünndarm der Ratte in das Akzeptorkompartiment übergetreten waren. Eine Deglykosylierung oder Konjugierung mit Glucuronsäure konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden. Die prozentualen Resorptionsquoten betrugen für Hyperosid 3,04 % ($R=2,67$) und für Rutin 2,45 % ($R=2,42$), die Resorptionsraten bzgl. der Stoffmenge und der Länge der Darmsegmente für Hyperosid 11,18 nmol/cm ($R=10,79$) und für Rutin 11,82 nmol/cm ($R=12,59$) für jeweils eine Inkubationszeit von 180 min. Auch in Form des Heißwasserextraktes der Birkenblätter wurde Hyperosid am Rattendünndarm absorbiert, der Extrakt veränderte jedoch weder Höhe noch Geschwindigkeit der Aufnahme in das Akzeptormedium. Als Absorptionsmechanismus für die polaren, zuckerhaltigen Verbindungen wurde der passive Transport durch die Poren der Tight junctions der Dünndarmzellen vorgeschlagen.

Bis zum gegenwärtigem Zeitpunkt existieren noch keine publizierten humanen Studien zur Wirksamkeit der Birkenblätter. Deshalb wurde mit 14 gesunden Probanden eine Pilotstudie durchgeführt, in der das ausgeschiedene Harnvolumen nach einmaliger Einnahme eines Birkenblättertees im Vergleich zu einer entsprechenden Menge Leitungswasser bestimmt wurde. Der individuelle Vergleich der Harnvolumina ergab bei der Hälfte der Probanden innerhalb der vierstündigen Testphase eine Zunahme der Harnproduktion, bei der anderen Hälfte stellte sich eine gegensätzliche Reaktion auf Birkenblätterttee und Placebo ein. Eine signifikante Erhöhung der Harnproduktion konnte unter dem angegebenen Studiendesign, auch unter Berücksichtigung des zeitabhängigen Harnvolumens zur Erkennung einer möglichen beschleunigten Flüssigkeitsausscheidung, somit nicht nachgewiesen werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ader, P.; Blöck, M.; Pietzsch, S.; Wolffram, S.: Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). *Cancer Lett.* 162 (2001), S.175-180
- Al-Tawha, K.: Zur Struktur der Saponine und Flavonoide von *Aster bellidifolium* (L.) SCOP. Dissertation (1997) Humboldt-Universität zu Berlin
- Andlauer, W.; Stumpf, C.; Fürst, P.: Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001), S.369-374
- Atopkina, L.N.; Malinovskaya, G.V.; Elyakov, G.B.; Uvarova, N.I.; Woerdenbag, H.J.; Koulman, A.; Pras, N.; Potier, P.: Cytotoxicity of natural ginseng glycosides and semisynthetic analogues. *Planta Med.* 65 (1999), S.30-34
- Baba, S.; Furuta, T.; Horie, M.; Nakagawa, H.N.: Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVI: Determination of urinary metabolites of rutin in humans. *J. Pharm. Sci.* 70 (1981), S.780-782
- Beaumont, A.; Fournie-Zaluski, M.-C.; Roque, B.P.: Neutral endopeptidase-24.11: structure, and design and clinical use of inhibitors. Hrsg.: Hooper, N.M.: Zinc metalloproteases in health and disease. Taylor & Francis, London (1996), S.105-129
- Betulae folium - Birch leaf, ESCOP-Monographie. März 1996
- Böhm, M.: 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 19.-21. April 2001, Mannheim, Abstract H1146. 11.11.2001 21:00, http://www.dgkardio.de/~hoare/f01_main.htm
- Bokkenheuser, V.D.; Shackleton, C.H.; Winter, J.: Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochem. J.* 248 (1987), S.953-956
- Chatterjee, S.S.; Koch, E.; Jaggy, H.; Krzeminski, T.: In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zur kardioprotektiven Wirkung von oligomeren Procyanidinen in einem *Crataegus*-Extrakt aus Blättern mit Blüten. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 47 (1997), S.821-825

- Chen, H.; Noble, F.; Roques, B.P.; Fournie-Zaluski, M.C.: Long lasting antinociceptive properties of enkephalin degrading enzyme (NEP and APN) inhibitor prodrugs. *J. Med. Chem.* 44 (2001), S.3523-3530
- Chipkin, R.E.: Inhibitors of enkephalinase: the next generation of analgesics. *Drugs of the Future* 11 (1986), S.593-606
- Choudhury, R.; Srai, S.K.; Debnam, E.; Rice-Evans, C.A.: Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999), S.278-286
- Clifford, A.J.; Ebeler, S.E.; Ebeler, J.D.; Bills, N.D.; Hinrichs, S.H.; Teissedre, P.L.; Waterhouse, A.L.: Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *Am. J. Clin. Nutr.* 64 (1996), S.748-756
- Constant, J.: Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Coron. Artery Dis.* 8 (1997), S.645-649
- Crespy, V.; Morand, C.; Manach, C.; Besson, C.; Demigne, C.; Remesy, C.: Part of quercetin in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am. J. Physiol.* 277 (1999), S.G120-G126
- Czygan, F.C.: *Betula pendula* - Die Birke. *Z. Phytotherapie* 10 (1989), S.135-139
- Damianiki, A.; Bakogeorgou, E.; Kampa, M.; Notas, G.; Hatzoglou, A.; Panagiotou, S.; Gametzi, C.; Kouroumalis, E.; Martin, P.M.; Castanas, E.: Potent inhibitory action of red wine on human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 78 (2000), S.429-441
- Day, A.J.; Bao, Y.; Morgan, M.R.; Williamson, G.: Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000a), S.1234-1243
- Day, A.J.; Canada, F.J.; Diaz, C.D.; Kroon, P.A.; Mclauchlan, R.; Faulds, C.B.; Plumb, G.W.; Morgan, R.A.; Williamson, G.: Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 468 (2000b), S.166-170
- Day, A.J.; DuPont, S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes, M.J.C.; Morgan, M.R.A.; Williamson, G.: Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 436 (1998), S.71-75

- de Vries, J.H.; Janssen, P.L.; Hollman, P.C.; van Staveren, W.A.; Katan, M.B.: Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. *Cancer Lett.* 114 (1997), S.141-144
- Dingermann, T. (Hrsg.): Transparenzkriterien für pflanzliche, homöopathische und anthroposophische Arzneimittel. Karger, Basel [u.a.] (2000), S.15-16, 39-40
- Djerassi, J.: Dictionary of natural products. Chapman & Hall, London [u.a.] (1994), S.3067
- Doan, D.D.; Nguyen N.H.; Doan H.K.; Nguyen T.L.; Phan, T.S.; van Dau, N.; Grabe, M.; Johansson, R.; Lindgren, G.; Stjernström, N.E.: Studies on the individual and combined diuretic effects of four Vietnamese traditional herbal remedies (*Zea mays*, *Imperata cylindrica*, *Plantago major* and *Orthosiphon stamineus*). *J. Ethnopharmacol.* 36 (1992), S.225-231
- Donovan, J.L.; Bell, J.R.; Kasim-Karakas, S.; German, J.B.; Walzem, R.L.; Hansen, R.J.; Waterhouse, A.L.: Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J. Nutr.* 129 (1999), S.1662-1668
- Dufresne, C.J.; Farnworth, E.R.: A review of latest research findings on health promotion properties of tea. *J. Nutr. Biochem.* 12 (2001), S.404-421
- Elattar, T.M.A.; Virji, A.S.: The effect of red wine and its components on growth and proliferation of Human Oral Squamous Carcinoma Cells. *Anticancer Res.* 19 (1999), S.5407-5414
- Englert, J.; Harnischfeger, G.: Diuretic action of aqueous *Orthosiphon* extract in rats. *Planta Med.* 58 (1992), S.237-238
- Erlund, I.; Kosonen, T.; Alfthan, G.; Maenpää, J.; Perttunen, K.; Kenraali, J.; Parantainen, J.; Aro, A.: Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56 (2000), S.545-553
- Escher, F.: Einfluss von Rotwein-Extraktivstoffen auf Metallopeptidasen in vitro. Diplomarbeit (2000) Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Evers, M.; Poujade, C.; Soler, F.; Ribeill, Y.; James, C.; Lelievre, Y.; Guegeun, J.C.; Reisdorf, D.; Morize, I.; Pauwels, R.; De Clerq, E.; Henin, Y.; Bousseau, A.; Mayaux, J.F.; Le Pecq, J.B.; Dereu, N.: Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of actions. *J. Med. Chem.* 39 (1996), S.1056-1068

- Forssmann, W.-G.; Richter, R.; Meyer, M.: The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem. Cell. Biol.* 110 (1998), S.335-357
- Förstermann, U.: Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: die Blutgefäße – Behandlung von Hypertonie und Hypotonie. Hrsg.: Forth, W. [u.a.]: Allgemeine und spezielle Pharmakologie. 8., vollst.überarb. Aufl., Urban & Fischer, München Jena (2001), S.479-487
- Friedland, J.; Silverstein, E.: A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am. J. Clin. Pathol.* 66 (1976), S.416-424
- Fujii, H.; Nakajima, M.; Aoyagi, T.; Tsuruo, T.: Inhibition of tumor cell invasion and matrix degradation by aminopeptidase inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.* 19 (1996a), S.6-10
- Fujii, H.; Yosizawa, K.; Maruyama, S.; Abe, F.: [Growth inhibitory effects of ubenimex on leukemic cell lines resistant to chemotherapeutic agents]. *Jpn. J. Antibiot.* 49 (1996b), S.1109-1115
- Fulda, S.; Friesen, C.; Los, M.; Scaffidi, C.; Mier, W.; Benedict, B.; Nunez, G.; Krammer, P.H.; Peter, M.E.; Debatin, K.M.: Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 57 (1997), S.4956-4964
- Fulda, S.; Jeremias, I.; Steiner, H.H.; Pietsch, T.; Debatin, K.M.: Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain tumor cells. *Int. J. Cancer* 82 (1999), S.435-441
- Gee, J.M.; DuPont, M.S.; Das, A.J.; Plumb, G.W.; Williamson, G.; Johnson, T.: Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr.* 130 (2000), S.2765-2771
- Gillespie, T.J.; Konings, P.N.; Merrill, B.J.; Davis, T.P.: A specific enzyme assay for aminopeptidase M in rat brain. *Life Sci.* 51 (1992), S.2097-2106
- Good, J.M.; Peters, M.; Wilkins, M.; Jackson, N.; Oakley, C.M.; Cleland, J.G.: Renal response to candoxatrilat in patients with heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 25 (1995), S.1273-1281

- Gorecki, P.; Seiz, K.: *Betula*. Hrsg.: Hänsel, R. [u.a.]: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Band 4 Drogen A-G, 5. vollst. neubearb. Aufl., Springer, Berlin [u.a.] (1992), S.500-509
- Gräfe, E.U.: Relative und systemische Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Quercetin und Quercetinglykosiden (Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3-O-rutinosid) im Menschen. Dissertation (2000) Universität Würzburg
- Hänsel, R., Hörhammer, L.: Vergleichende Untersuchungen über die Flavonglykoside der Betulaceen. Arch. Pharm. 287 (1954), S.117-126
- Hertog, M.G.; Hollman, P.C.; Katan, M.B.; Kromhout, D.: Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. Nutr. Cancer 20 (1993), S.21-29
- Hiermann, A.; Kartnig, Th.; Azzam, S.: Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung der Proanthocyanidine in Crataegus. Sci. Pharm. 54 (1986), S.331-337
- Hiller, K.; Bader, G.: Goldrutenkraut, Die Gattung Solidago – eine pharmazeutische Bewertung. Z. Phytotherapie 17 (1996), S.123-130
- Hilp, K.: Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von Ononis spinosa L.. Dissertation (1976) Universität Marburg
- Hilpisch, U.; Hartmann, R.; Glombitza, K.-W.: New dammaranes, esterified with malonic acid from leaves of Betula pendula. Planta Med. 63 (1997), S.347-351
- Hollman, P.C.; de Vries, J.H.; van Leeuwen, S.D.; Mengelers, M.J.; Katan, M.B.: Absorption of dietary glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am. J. Clin. Nutr. 62 (1995), S.1276-1282
- Hooper, N.M.: The biological roles of zinc and families of zinc metalloproteases. Hrsg.: Hooper, N.M.: Zinc metalloproteases in health and disease. Taylor & Francis, London (1996), S.1-17
- Hooper, N.M.: Families of zinc metalloproteases. FEBS Lett. 356 (1994), S.1-6
- Ikeda, S.; Ishihara, K.; Taguchi, G.: [Phase III study of bestatin in patients with malignant tumors (1) Malignant melanoma]. Gan To Kagaku Ryoho 12 (1985), S.77-85
- Ioku, K.; Pongpiriyadacha, Y.; Konishi, Y.; Takei, Y.; Nakatani, N.; Terao, J.: Beta-Glucosidase activity in rat small intestine toward quercetin monoglucosides. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (1998), S.1428-1431

- Justesen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T.: Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS. *Cancer Lett.* 114 (1997), S.165-167
- Kameda, K.; Takaku, T.; Okuda, H.; Kimura, Y.: Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J. Nat. Prod.* 50 (1987), S.680-683
- Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L.M.; Chen, C.H.; Garrett, P.E.; Lee, K.H.: Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* 39 (1996), S.1016-1017
- Kaul, R.: Pflanzliche Procyanidine, Vorkommen, Klassifikation und pharmakologische Wirkungen. *Pharmazie in unserer Zeit* 25 (1996), S.175-185
- Keinänen, M.; Julkunen-Tiitto, R.: High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *J. Chromatogr. A* 793 (1998), S.370-377
- Kenny, A.J.: Regulatory peptide metabolism at cell surfaces: The key role of endopeptidase-24.11. *Biomed. Biochim. Acta* 45 (1986), S.1503-1513
- Kim, D.H.; Jung, E.A.; Sohng, I.S.; Han, J.A.; Kim, T.H.; Han, M.J.: Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* 21 (1998), S.17-23
- Koehne, P.: Die Regulation der NEP-Synthese in menschlichen Endothelzellen. Dissertation (1997) Humboldt-Universität zu Berlin
- Konkoy, C.S.; Davis, T.P.: Ectoenzymes as sites of peptide regulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 17 (1996), S.288-294
- Koscielny, J.; Radtke, H.; Hoffman, K.H.; Jung, F.; Müller, A.; Grützner, K.I.; Kieseewetter, H.: Fagorutin-Tee bei chronisch venöser Insuffizienz (CVI), Nachweis der klinischen und ödemprotektiven Wirksamkeit, Randomisierte plazebokontrollierte Phase-IV-Doppelblindstudie. *Z. Phytotherapie* 17 (1996), S.147-159
- Laurent, S.; Boutouyrie, P.; Azizi, M.; Marie, C.; Schwartz, J.C.; Lecomte, J.M.; Bralet, J.: Antihypertensive effects of fasidotril, a dual inhibitor of neprilysin and angiotensin-converting enzyme, in rats and humans. *Hypertension* 35 (2000), S.1148-1153

- Lendeckel, U.; Wex, T.; Reinhold, D.; Kahne, T.; Frank, K.; Faust, J.; Neubert, K.; Ansorge, S.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem. J.* 319 (1996), S.817-821
- Leuschner, J.: Anti-inflammatory, spasmolytic and diuretic effects of a commercially available *Solidago gigantea* Herb. Extract. *Arzneimittelforschung* 45 (1995), S.165-168
- Lingham, T.; Perlanski, E.; Grupp, L.A.: Angiotensin converting enzyme inhibitors reduce alcohol consumption: some possible mechanisms and important conditions for its therapeutic use. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14 (1990), S.92-99
- Ma, T.Y.; Tran, D.; Hoa, N.; Nguyen, D.; Merryfield, M.; Tarnawski, A.: Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement. *Microsc. Res. Tech.* 15 (2000), S.156-168
- Maiani, G.; Serafini, M.; Salucci, M.; Azzini, E.; Ferro-Luzzi, A.: Application of a new high-performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma. *J. Chromatogr. B* 692 (1997), S.311-317
- Manach, C.; Morand, C.; Crespy, V.; Demigne, C.; Texier, O.; Regerat, F.: Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* 426 (1998), S.331-336
- Manach, C.; Morand, C.; Demigne, C.; Texier, O.; Regerat, F.; Remesy, C.: Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.* 409 (1997), S.12-16
- Mauri, P.L.; Iemoli, L.; Gardana, C.; Riso, P.; Simonetti, P.; Porrini, M.; Pietta, P.G.P.: Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry characterization of flavonol glycosides in tomato extracts and human plasma. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 13 (1999), S.924-931
- Melzig, M.F.; Pieper, S.; Siems, W.-E.; Heder, G.; Böttger, A.; Liberra, A.; Lindequist, U.: Screening of selected basidiomycetes for inhibitory activity on neutral endopeptidase (NEP) and angiotensin-converting enzyme (ACE). *Pharmazie* 51 (1996), S.501-503
- Menrad, A.; Speicher, D.; Wacker, J.; Herlyn, M.: Biochemical and functional characterization of aminopeptidase expressed by human melanoma cells. *Cancer Res.* 53 (1993), S.1450-1455
- Metz, G.: Teetinken als Königsdisziplin. *Pharm. Ztg.* 145 (2000a), S.2526-2530

- Metz, G.: Wein und Olivenöl sind ein potentes Duo. Pharm. Ztg. 145 (2000b), S.2779-2784
- Meunier, M.-T.; Villie, F.; Jonadet, M.; Bastide, J.; Bastide, P.: Inhibition of angiotensin I converting enzyme by flavanolic compounds: in vitro and in vivo studies. Planta Med. 53 (1987), S.12-15
- Milewicz, A.; Iwankiewicz, G.; Zareba, E.; Podgorski, F.; Plamieniak, Z.; Teucher, T.; Schmitz, H.: Aquaretischer Effekt eines pflanzlichen Kombinationsarzneimittels bei Frauen mit Ödemen unterschiedlicher Genese. Pharmazeutische Rundschau 36 (1994), S.22-26
- Mizuma T.; Ohta, K.; Hayashi, M.; Awazu, S.: Comparative study of active absorption by the intestine and disposition of anomers of sugar-conjugated compounds. Biochem. Pharmacol. 45 (1993), S.1520-1523
- Morand, C.; Manach, C.; Crespy, V.; Remesy, C.: Quercetin-3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. Free Radic. Res. 33 (2000), S. 667-667
- Murota, K.; Shimizu, S.; Chujo, H.; Moon, J.H.; Terao, J.: Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2. Arch. Biochem. Biophys. 384 (2000), S.391-397
- Nagourney, R.A.; Su, Y.Z.; Makalinalo, A.J.; Ciarolla, A.; Evans, S.S.: Preliminary analysis of betulinic acid in human tumor primary cultures. Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. 37 (1996), A2724
- Nahrstedt, A.: Pflanzliche Urologica - eine kritische Übersicht. Pharm. Ztg. 138 (1993), S.1439-1450
- Nikaido, T.; Ohmoro, T.; Sankawa, U.; Hamanaka, T.; Totsuka, K.: Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by flavonoids. Planta Med. 46 (1982), S.162-166
- Norta, M.; Schöpke, T.: An in vitro perfusion model for the determination of absorption properties of drugs in isolated rat small intestine. Pharmazie 51 (1996), S.101-103
- Noteborn, H.P.J.M.; Jansen, E.; Benito, S.; Mengelers, M.J.B.: Oral absorption and metabolism of quercetin and sugar-conjugated derivatives in specific transport systems. Cancer Lett. 114 (1997), S.175-177

- Ossipov, V.; Nurmi, K.; Loponen, J.; Haukioja, E.; Pihlaja, K.: High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *J. Chromatogr. A* 721 (1996), S.59-68
- Parellada, J.; Guinea, M.: Flavonoid inhibitors of trypsin and leucine aminopeptidase: a proposed mathematical model for IC₅₀ estimation. *J. Nat. Prod.* 58 (1995), S.823-829
- Parellada, J.; Suarez, G.; Guinea, M.: Inhibition of zinc metallopeptidases by flavonoids and related phenolic compounds. *J. Enzyme Inhib.* 13 (1998), S.347-359
- Pfeifer, S.; Pfliegel, P.; Borchert, H.-H.: *Biopharmazie: Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Biotransformation*. 3. überarb. Aufl., Ullstein Mosby, Berlin Wiesbaden (1995), S.47-48
- Pforte, H.; Hempel, J.; Jacobasch, G.: Distribution pattern of a flavonoid extract in the gastrointestinal lumen and wall of rats. *Nahrung* 43 (1999), S.205-208
- Pietta, P.G.; Gardana, C.; Mauri, P.L.: Identification of Ginkgo biloba flavonol metabolites after oral administration to humans. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 693 (1997), S.249-255
- Pietta, P.G.; Gardana, C.; Mauri, P.L.; Maffei-Facino, R.; Carini, M.: Identification of flavonoid metabolites after oral administration to rats of a Ginkgo biloba extract. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 673 (1995), S.75-80
- Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.S.; Chagwedera, T.E.; Farnsworth, N.R.; Cordell, G.A.; Beecher, C.W.; Fong, H.H.; Kinghorn, A.D.; Brown, D.M.: Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* 1 (1995), S.1046-1051
- Piskula, M.K.; Terao, J.: Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998), S.4313-4317
- Pulido-Cejudo, G.; Conway, B.; Proulx, P.; Brown, R.; Izaguirre C.A.: Bestatin mediated inhibition of leucine aminopeptidase may hinder HIV infection. *Antiviral Res.* 36 (1997), S.167-177
- Rebuelta, M.; San Roma, L.; G.-Serra Nillos, M.: Etude de l'effet diuretique de diferentes preparations de l'*Ononis spinosa* L.. *Plantes Med. Phytother.* 15 (1981); S.99-108

- Rehn, D.; Brunnauer, H.; Diebschlag, W.; Lehmacher, W.: Investigation of the therapeutic equivalence of O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides following multiple peroral administration. *Arzneimittelforschung* 46 (1996), S.488-492
- Rickling, B.; Glombitza, K.-W.: Saponins in the leaves of birch? Hemolytic dammarane triterpenoid esters of *Betula pendula*. *Planta Med.* 59 (1993), S.76-79
- Riemersma, R.A.; Rice-Evans, C.A.; Tyrell, R.M.; Clifford, M.N.; Lean, M.E.: Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJM* 94 (2001), S.277-282
- Rouleau, J.L.; Pfeffer, M.A.; Stewart, D.J.; Isaac, D.; Sestier, F.; Kerut, E.K.; Port, C.B.; Proulx, G.; Qian, C.; Block, A.J.: Comparison of vasopectidase inhibitor omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *Lancet* 356 (2000), S.615-620
- Salminen, J.-P.; Ossipov, V.; Lojonen, J.; Haukioja, E.; Pihlaja, K.: Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 864 (1999), S.283-291
- Scalbert, A.; Williamson, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130 Suppl. (2000), S.2073S-2085S
- Schalk, C.; d'Orchymont, H.; Jauch, M.F.; Tarnus, C.: 3-Amino-2-tetralone derivatives: novel potent and selectice inhibitors of aminopeptidase-M (EC 3.4.11.2). *Arch. Biochem. Biophys.* 311 (1994), S.42-46
- Schellenberger, A. (Hrsg.): *Enzymkatalyse*. 1. Aufl., Fischer, Jena (1989), S.219, 242-252
- Schilcher, H.: *Pharmakologie und Klinik der „pflanzlichen Diuretika“*. Hrsg.: Loew, D. [u.a.]: *Diuretika – Chemie, Pharmakologie und Therapie einschließlich Phytotherapie*. 3. neubearb. u. erw. Aufl., Thieme, Stuttgart New York (1992), S.300-322
- Schilcher, H.; Rau, H.: Nachweis der aquaretischen Wirkung von Birkenblätter- und Goldrutenauszügen im Tierversuch. *Urologe[B]* 28 (1988), S.274-280
- Schneider-Leukel, K.: *Untersuchungen zur Flavonoidfreisetzung aus Drogen und Drogenmischungen bei der Teezubereitung*. Dissertation (1994) Universität Regensburg

- Schubert, R.; Werner, K.; Meusel, H.: Exkursionsflora von Deutschland / Begr. von Werner Rothmaler. Band 2 Gefäßpflanzen: Grundband, 15., durchges. Aufl., Fischer, Jena Stuttgart (1994), S.145-146
- Schutzgemeinschaft Deutscher Wald e.V.: Die Sandbirke - Baum des Jahres 2000 (Baumfaltblatt Nr.15). 14.11.2001 09:30, <http://www.sdw-online.de/sandbirke.htm>
- Schwartz, J.C.: Racecadotril: a new approach to the treatment of diarrhoea. Int. J. Antimicrob. Agents 14 (2000), S.75-79
- Schwartz, J.C.; Gros, C.; Lecomte, J.M.; Bralet, J.: Enkephalinase (EC 3.4.24.11) inhibitors: protection of endogenous ANF against inactivation and potential therapeutic applications. Life Sci. 47 (1990), S.1279-1297
- Sesink, A.L.; O'Leary, K.A.; Hollman, P.C.: Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. J. Nutr. 131 (2001), S.1938-1941
- Shimoi, K.; Okada, H.; Furugori, M.; Goda, T.; Takase, S.; Suzuki, M.; Hara, Y.; Yamamoto, H.; Kinae, N.: Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-glucoside in rats and humans. FEBS Lett. 438 (1998), S.220-224
- Siems, W.E.; Halle, W.: Das Angiotensin-I-Converting-Enzym – Eigenschaften, Funktionen und Nachweismöglichkeiten. Pharmazie 37 (1982), S.539-544
- Skidgel, R.A.; Schulz, W.W.; Tam, L.T.; Erdös, E.G.: Human renal angiotensin I converting enzyme and neutral endopeptidase. Kidney Int. 31 (1987), S.S45-S48
- Soleas, G.J.; Diamandis, E.P.; Goldberg, D.M.: Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. J. Clin. Lab. Anal. 11 (1997a), S.287-313
- Soleas, G.J.; Diamandis, E.P.; Goldberg, D.M.: Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. Clin. Biochem. 30 (1997b), S.91-113
- Soler, F.; Poujade, C.; Evers, M.; Carry, J.C.; Henin, Y.; Bousseau, A.; Huet, T.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Mayaux, J.F.; Le Pecq, J.B.; Dereu, N.: Betulinic acid derivatives: a new class of specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry. J. Med. Chem. 39 (1996), S.1069-1083

- Spencer, J.P.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Srai, S.K.; Debnam, E.S.; Rice-Evans, C.: Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001), S.588-593
- Spencer, J.P.E.; Chowrimootoo, G.; Choudhury, R.; Debnam, E.S.; Srai, S.K.; Rice-Evans, C.: The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.* 458 (1999), S.224-230
- Steinecke, H.; Schubert, P.: Die Hängebirke- Baum des Jahres 2000. 14.11.2001 9:30, http://www.stadt-frankfurt.de/Palmengarten/deutsch/botanik/wissen/pfl_2000/betula.htm
- Stoewsand, G.S.; Anderson, J.L.; Munson, L.: Inhibition by wine of tumorigenesis induced by ethyl carbamat (urethane) in mice. *Food Chem. Toxicol.* 29 (1991), S.291-295
- Sun, H.H.; Kapitla, P.V.; Houck, D.R.; Stawicki, M.B.; McGarry, R.; Wahl, R.C.; Gillum, A.M.; Cooper, R.: A metalloproteinase inhibitor from *Doliocarpus verruculosus*. *Phytotherapy Res.* 10 (1996), S.194-197
- Taylor, A.: Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J.* 7 (1993), S.290-298
- Teuscher, E.: Biogene Arzneimittel. 5. überarb. und erw. Aufl., Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart (1997), S.391
- Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P.: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 5. völlig Neubearb. u. erw. Aufl., Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart (1999), S.78-79, 375, 443-444
- Trippodo, N.C.; Robl, J.A.; Asaad, M.M.; Fox, M.; Panchal, B.C.; Schaeffer, T.R.D.: Effects of omapatrilat in low, normal, and high renin experimental hypertension. *Am. J. Hypertens.* 11 (1998), S.363-372
- Tsukagoshi, S.: [A new antitumor drug with immunomodulating activity, ubenimex (bestatin)]. *Gan To Kagaku Ryoho* 14 (1987), S.2385-2391
- Turner, A.J.; Tanzawa, K.: Mammalian membrane metalloproteinases NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J.* 11 (1997), S.355-364
- Veit, M.: Probleme bei der Bewertung pflanzlicher Diuretika, als Beispiel Schachtelhalmkraut DAB 10 (*Equiseti herba*). *Z. Phytotherapie* 16 (1994), S.331-341

- Vlahovic, P.; Stefanovic, V.: Kidney ectopeptidases – structure, function and clinical significance. *Path. Biol.* 46 (1998), S.779-786
- Volak, J.; Stodola, J.: *Das große Buch der Heilpflanzen*. Artia, Praha (1983), S.82
- Volpert, O.V.; Ward, W.F.; Lingen, M.W.; Chesler, L.; Solt, D.B.; Johnson, M.D.; Molteni, A.; Polverini, P.J.; Bouck, N.P.: Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *J. Clin. Invest.* 98 (1996), S.671-679
- Wagner, H.; Blatt, S.: *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*. 2nd ed., Springer, Berlin [u.a.] (1996), S.224
- Wagner, H.; Elbl, G.; Lotter, H.; Guinea, M.: Evaluation of natural products as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE). *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1 (1991), S.15-18
- Walgren, R.A.; Lin, J.-T.; Kinne, R.K.-T.; Walle, T. R.: Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin-4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294 (2000a), S.837-843
- Walgren, R.A.; Karnaky, K.J.; Lindenmayer, G.E.; Walle, T.: Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 monolayers by apical multidrug resistance-associated Protein-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294 (2000b), S.830-836
- Walgren, R.A.; Walle, T.: The influence of plasma binding on absorption/exsorption in the Caco-2 model of human intestinal absorption. *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (1999), S.1037-1040
- Wallis E.J.; Ramsay, L.E.; Hettiarachchi, J.: Combined inhibition of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme by sampatrilat in essential hypertension. *Clin. Pharmacol. Ther.* 64 (1998), S.439-449
- Walter, M.; Unwin, R.; Nortier, J.; Deschodt-Lanckman, M.: Enhancing endogenous effects of natriuretic peptides: inhibitors of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and phosphodiesterase. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 6 (1997), S.468-473
- Wang, J.; Cooper, M.D.: *Aminopeptidases: structure and biological function*. Hrsg.: Hooper, N.M.: *Zinc metalloproteases in health and disease*. Taylor & Francis, London (1996), S.131-151

- Wichtl, M.: Birkenblätter – *Betulae folium*. Hrsg.: Hartke, K. [u.a.]: Kommentar zum Europäischen Arzneibuch. Band II/1 Monographien A-B, 14. Lieferung, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart (2001), S.B39
- Widmann, C.; Gibson, S.; Johnson, G.L.: Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), S.7141-7147
- Williams, T.A.; Soubrier, F.; Corvol, P.: Biochemical, molecular and genetic aspects of angiotensin I-converting enzyme. Hrsg.: Hooper, N.M.: Zinc metalloproteases in health and disease. Taylor & Francis, London (1996), S.83-104
- Winkler, A.; Buzas, B.; Siems, W.-E.; Heder, G.; Cox, B.M.: Effect of ethanol drinking on the gene expression of opiod receptors, enkephalinase, and angiotensin-converting enzyme in two inbred mice strains. *Alcoholism Clin. Exper. Res.* 22 (1998), S.1262-1271
- Wittig, J.; Herderich, M.; Graefe, E.U.; Veit, M.: Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 753 (2001), S.237-243
- Young, J.F.; Nielsen, S.E.; Haraldsdottir, J.; Daneshvar, B.; Lauridsen, S.T.; Knuthsen, P.; Crozier, A.; Sandstrom, B.; Dragsted, L.O.: Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (1999), S.87-94
- Zapfe, G.: Clinical efficacy of *Crataegus* extract WS 1441 in congestive heart failure NYHA class II. *Phytomedicine* 8 (2001), S.262-266
- Zhu, M.; Chen, Y.; Li, R.C.: Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Med.* 66 (2000), S.444-447

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, im Dezember 2001

Lebenslauf

Hedda Major geb. Bormann

10. Februar 1972	geboren in Berlin
Juli 1990	Abitur an der Heinrich-Hertz-Oberschule Berlin, Spezialschule mathematisch- naturwissenschaftlich-technischer Richtung
September 1990 – August 1991	Vorpraktikum in der Apotheke des Städtischen Krankenhauses im Friedrichshain, Berlin
September 1991 – März 1992	Praktikum in der Heinrich-Heine-Apotheke, Berlin-Mitte
April 1992 – März 1996	Pharmaziestudium an der Humboldt-Universität zu Berlin
Oktober 1996 – März 1997	Pharmaziepraktikantin in der Adler-Apotheke, Berlin-Lichtenberg
Juni 1997	Approbation als Apothekerin
seit Juni 1996	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biologie, Prof. Dr. M.F. Melzig

Publikationsliste

Originalarbeiten und Kurzmitteilungen:

Melzig, M.F.; Bormann, H.; Heder, G.; Siems, W.E.; Hostettmann, K.: Inhibition of neutral metalloendopeptidase and angiotensin-converting enzyme by selected naturally occurring chromone derivatives. *Pharmazie* 53 (1998), S.804-805

Melzig, M.F.; Bormann, H.: Betulinic acid inhibits aminopeptidase N activity. *Planta Med.* 65 (1998), S.655-656

Bormann, H.; Melzig, M.F.: Inhibition of metallopeptidases by flavonoids and related compounds. *Pharmazie* 55 (2000), S.129-132

Melzig, M.F.; Major, H.: Neue Aspekte zum Verständnis des Wirkungsmechanismus der aquareitischen Wirkung von Birkenblättern und Goldrutenkraut. *Z. Phytotherapie* 21 (2000), S.193-196

Posterbeiträge:

Bormann, H.; Melzig, M.F.: Inhibition of metallopeptidases by flavonoids and related compounds. 1st European Graduate Student Meeting, 20.-22.02.1998 Frankfurt/Main, Poster 12

Bormann, H.; Melzig, M.F.: Inhibition of metallopeptidases by flavonoids and related compounds. 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, 31.08.-04.09.1998, Wien, Poster J24

Bormann, H.; Melzig, M.F.: Inhibitory effects of leaf extracts from *Betula pendula* on metallopeptidases. Joint Meeting of American Society of Pharmacognosy, Association Francaise pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie, Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Phytochemical Society of Europe "2000 Years of Natural Product Research – Past, Present and Future", 26.-30.07.1999, Amsterdam, Poster 306

Major, H.; Melzig, M.F.: Absorption of the flavonoid hyperoside from a *Betula pendula* extract in an isolated rat small intestine model. International Congress and 48th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, 03.-07.09.2000, Zürich, Poster P2A/59

Major, H.; Rennert, B.; Kreuter, M.H.; Netsch, M.; Melzig, M.F.: Effects of green tea extract and its polyphenols on various peptidases. International Congress and 49th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, 02.-06.09.2001, Erlangen, Poster 3.40

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M.F. Melzig für die Überlassung des interessanten Themas, für die intensive Betreuung während der praktischen Arbeit und der Niederschrift der Ergebnisse. Ich danke ihm für die vielen anregenden Gespräche, zu Themen der Dissertation und darüber hinaus zu Wissenschaft und Alltag.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biologie für die freundschaftliche Zusammenarbeit bei der wissenschaftlichen Arbeit und der gemeinsamen Gestaltung der studentischen Praktika. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Beate Rennert und ihr sowohl für die wunderbare Arbeitsatmosphäre im Labor E9 als auch ihre stete Hilfsbereitschaft danken.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Hauses bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit in den Jahren am Institut für Pharmazie. Ich danke besonders den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biopharmazie für die Unterstützung bei der Durchführung der Resorptionsuntersuchungen.

Bei der Arbeitsgruppe von Dr. W.-E. Siems am FMP bedanke ich mich für die gute Einarbeitung in die biochemischen Untersuchungsmethoden.

Meinen Eltern danke ich für die wertvolle Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Ausbildung, von der Schulzeit, über das Studium bis zur Promotion.

Abschließend danke ich Christian, durch seine Motivation, hilfreiche Kritiken und seine Fürsorglichkeit hat er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.